



Inhibidors de cinases com a estratègia terapèutica en neoplàsies limfoides

Laia Rosich Moya

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

PROGRAMA DE DOCTORAT EN BIOMEDICINA

Línia de recerca de Biologia Molecular i Cel·lular del Càncer

2009-2014



Facultat de Medicina

Universitat de Barcelona

Inhibidors de cinases com a estratègia terapèutica en neoplàsies limfoides

Tesi presentada per

Laia Rosich i Moya

Per optar al grau de

Doctora en Biomedicina

Tesi doctoral realitzada a l'Hospital Clínic de Barcelona-IDIBAPS sota la co-direcció del

Dr. Gaël Roué i la Dra. Dolors Colomer

Laia Rosich i Moya

La doctoranda

Dr. Gaël Roué

El co-director de la tesi

Dra. Dolors Colomer i Pujol

La co-directora de la tesi

Barcelona, març de 2014

El Dr. Gaël Roué, investigador de l'IDIBAPS, i la Dra. Dolors Colomer i Pujol, consultora sènior de la Unitat d'Hematopatologia de l'Hospital Clínic de Barcelona i cap de recerca del grup de fisiopatologia i bases moleculars en hematologia de l'Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS)

CERTIFIQUEN

- Que la tesi doctoral titulada "Inhibidors de cinases com a estratègia terapèutica en neoplàsies limfoides", presentada per Laia Rosich i Moya per tal d'accedir al títol de Doctora en Biomedicina, ha estat realitzada sota la seva co-direcció i compleix els requisits formals i científics per a ser defensada davant del tribunal corresponent.
- Que dos dels articles derivats d'aquesta tesi doctoral han estat publicats a *Clinical Cancer Research* (2012), seguit d'una ressenya a *Autophagy* (2013), i a *Haematologica* (2013), i el tercer està en revisió a *Clinical Cancer Research*.
- Que el factor d'impacte corresponent a l'any 2012 de les revistes científiques on s'han publicat els articles d'aquesta tesi doctoral és de 7.837 (*Clinical Cancer Research*), 12.042 (*Autophagy*) i 5.935 (*Haematologica*).

Dr. Gaël Roué

Dra. Dolors Colomer i Pujol

Barcelona, març de 2014

*A totes aquelles persones que viuen
o han viscut el càncer de ben a prop*

A la meua família

El terme leucèmia prové de dues paraules gregues *leukos* (blanc) i *aima* (sang), a partir de la observació d'una mostra de sang d'un pacient realitzada pel patòleg Rudolf Virchow a l'any 1845



Índex

ÍNDEX I

Índex de taules i figures VII

SELECCIÓ D'ABREVIACIONS IX

INTRODUCCIÓ 1

1. Neoplàsies limfoides de cèl·lula B	5
1.1. El limfoma de cèl·lules del mantell	5
• Introducció	5
• Diagnòstic	6
• Origen del MCL	6
• Curs clínic: MCL no nodal	7
• El rol de la ciclina D1 en MCL	8
o MCL ciclina D1 negatiu	8
• Vies de senyalització alterades en MCL	9
o Cicle cel·lular	9
o Vies de resposta al dany del DNA	9
o Vies de supervivència cel·lular	11
o Vies implicades en la interacció amb el microambient	11
• Pronòstic	12
• Tractaments actuals	12
1.2. La leucèmia limfàtica crònica	13
• Introducció	13
• Diagnòstic	13
• Origen de la CLL	14
• Curs clínic	14
• El genoma de la CLL	15
o Alteracions citogenètiques	15
o Alteracions genòmiques	16
o Alteracions epigenètiques	17
• Pronòstic	17
o Estadiatge de la CLL	17

o	Marcadors sèrics	17
o	Alteracions genètiques	18
•	Impacte del microambient en la CLL	18
•	Tractaments actuals	20
o	Quimioresistència	21
o	Nous fàrmacs en desenvolupament clínic	22
2.	Inhibidors de cinases com a estratègia terapèutica en les neoplàsies limfoides de cèl·lula B	23
2.1.	Inhibidors de la senyalització del BCR	23
•	Senyalització del BCR	23
•	Inhibidors de SYK	24
•	Inhibidors de BTK	25
2.2.	Inhibidors de la via de senyalització PI3K/AKT/mTOR	26
•	Via de senyalització PI3K/AKT/mTOR	27
•	PI3K com a diana terapèutica	29
o	Inhibidors de PI3K	30
•	AKT com a diana terapèutica	32
o	Inhibidors d'AKT	33
•	mTOR com a diana terapèutica	34
o	Rapamicina i Rapalogs	35
o	Limitacions dels rapalogs	36
o	Inhibidors de mTOR ATP-competitius	37
o	Inhibidors duals PI3K/mTOR	38
2.3.	Inhibidors de la via de NFκB	39
2.4.	Inhibidors de la via de MAPK	39
3.	Inhibidors de proteïnes reguladores de la mort cel·lular com a estratègia terapèutica en les neoplàsies limfoides de cèl·lula B	41
3.1.	La família BCL2 com a diana terapèutica	41
•	La família de proteïnes BCL2	41
•	Inhibidors dels membres antiapoptòtics de la família BCL2	43

3.2. L'autofàgia com a diana terapèutica	43
• La maquinària de l'autofàgia	44
• Autofàgia i càncer	46
o Autofàgia com un mecanisme supressor de tumors	46
o L'autofàgia com un mecanisme de progressió tumoral	47
• Fàrmacs moduladors de l'autofàgia	48
OBJECTIUS	49
RESULTATS	53
Primer article	55
L'inhibidor de fosfatidilinositol-3-cinasa NVP-BKM120 supera la resistència a senyals derivats del microambient mitjançant la regulació de l'axis AKT/FOXO3A/BIM en cèl·lules de leucèmia limfàtica crònica	
Segon article	71
Contrarestar l'autofàgia supera la resistència a everolimus en el limfoma de cèl·lules del mantell	
Tercer article	87
La inhibició dual de PI3K/mTOR és requerida per interferir de forma eficaç en els senyals de supervivència del microambient en el limfoma de cèl·lules del mantell	
DISCUSSIÓ	119
1. La inhibició de PI3K mitjançant NVP-BKM120	121
1.1. Mecanisme d'acció de NVP-BKM120	122
1.2. NVP-BKM120 i els seus efectes en el microambient tumoral	123
1.3. Inhibir una o totes les isoformes de PI3K?	124
2. La inhibició de mTOR mitjançant everolimus	125
2.1. Inhibir una única diana o més d'una en la via de PI3K/AKT/mTOR?	126
3. La inhibició de mTOR i PI3K mitjançant NVP-BE225	127

4. Identificació de biomarcadors	129
5. Diances terapèutiques alternatives emergents de la via PI3K/AKT/mTOR	130
6. Combinació racional de teràpies	130
7. Qüestions no resoltes	133
CONCLUSIONS	135
REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES	139
ANNEXOS	169
Annex 1: Ressenya del segon article	171
Annex 2: Presentació en congressos dels treballs d'aquesta tesi	177
Annex 3: Publicacions en col·laboració	179
AGRAÏMENTS	185

ÍNDEX DE TAULES I FIGURES

Taula 1.	Selecció d'alteracions genòmiques recurrents en el MCL.	10
Taula 2.	Selecció d'alteracions genètiques recurrents en CLL.	16
Taula 3.	Selecció de proteïnes implicades en l'autofàgia.	45
Taula 4.	Selecció d'estudis de combinació amb inhibidors del BCR i de la via PI3K/AKT/mTOR.	131
Figura 1.	Variants morfològiques del MCL.	6
Figura 2.	Hipotètic model de l'origen del MCL i dels seus subtipus moleculars.	8
Figura 3.	Sang perifèrica d'un pacient amb CLL.	13
Figura 4.	Hipotètic model de l'origen de la CLL i dels seus subtipus moleculars.	15
Figura 5.	Pronòstic de la CLL segons l'estat mutacional del gen de les immunoglobulines.	17
Figura 6.	Pronòstic de la CLL segons la integració del model mutacional i citogenètic.	18
Figura 7.	El microambient de la CLL.	19
Figura 8.	Efecte del tractament en l'evolució clonal de la CLL.	21
Figura 9.	Senyalització del BCR i inhibidors utilitzats per interferir la via.	24
Figura 10.	Selecció d'inhibidors de la via PI3K/AKT/mTOR.	27
Figura 11.	Via de senyalització PI3K/AKT/mTOR.	28
Figura 12.	Principals dianes d'AKT.	33
Figura 13.	Bucles compensatoris en la via de mTOR.	37
Figura 14.	Les BH3- <i>only</i> i els BH3-mimètics.	42
Figura 15.	El procés autofàgic i fàrmacs moduladors de l'autofàgia.	44
Figura 16.	Relació funcional entre l'autofàgia i l'apoptosi.	47



Selecció d'abreviacions

4EBP1	<i>4E-Binding Protein 1</i>
AKT	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>
AMP	<i>Adenosine Monophosphate</i>
AMPK	<i>Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase</i>
ATG	<i>Autophagy-related</i>
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia-Mutated</i>
ATP	<i>Adenosine Triphosphate</i>
BAK	<i>BCL2-antagonist</i>
BAX	<i>BCL2-Associated X protein</i>
BCL2	<i>B-Cell Leukemia/lymphoma 2</i>
BCR	<i>B-Cell Receptor</i>
BIM	<i>BCL2-like 11</i>
BIRC3	<i>Baculoviral IAP Repeat Containing 3</i>
BMSC	<i>Bone Marrow Stromal Cells</i>
BTK	<i>Bruton Tyrosine Kinase</i>
CCL	<i>Chemokine (C-C motif) Ligand</i>
CCND1	<i>Cyclin D1</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CLL	<i>Chronic Lymphocytic Leukemia</i>
CXCR4/5	<i>Chemokine C-X-C motif Receptor 4/5</i>
DEPTOR	<i>DEP domain containing mTOR-interacting protein</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EIF4B	<i>Eukaryotic translation Initiation Factor 4B</i>
EIF4E	<i>Eukaryotic translation Initiation Factor 4E</i>
ERK	<i>Extracellular Regulated Kinase</i>
FDA	<i>American Food and Drug Administration</i>
FL	<i>Follicular Lymphoma</i>
FOXO	<i>Forkhead box O</i>
GSK3	<i>Glycogen Synthase Kinase 3</i>
GTP	<i>Guanosine-5'-triphosphate</i>
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
Ig	<i>Immunoglobulin</i>

IGHV	<i>Immunoglobulin Heavy chain Variable region</i>
IKK	<i>IκB kinase</i>
IRS1/2	<i>Insulin Receptor Substrate 1/2</i>
IκB	<i>Inhibitor of κB</i>
JAK	<i>Janus Kinase</i>
KDa	<i>Kilodaltons</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MBL	<i>Monoclonal B cell Lymphocytosis</i>
MCL	<i>Mantle Cell Lymphoma</i>
MCL1	<i>Myeloid Cell Leukemia 1</i>
M-CLL	<i>Mutated-CLL</i>
mLST8	<i>mammalian Lethal with SEC13 protein 8</i>
mTOR	<i>mammalian Target Of Rapamycin</i>
MYD88	<i>Myeloid Differentiation primary response gene 88</i>
NFκB	<i>Nuclear Factor Kappa B</i>
NHL	<i>Non-Hodgkin Lymphoma</i>
ORR	<i>Overall Response Rate</i>
PK1	<i>Pyruvate Dehydrogenase Kinase, isozyme 1</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-3-Kinase</i>
PIP ₂	<i>Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate</i>
PIP ₃	<i>Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate</i>
PLCγ	<i>Phospholipase Cγ</i>
POT1	<i>Protection Of Telomeres 1</i>
PRAS40	<i>Proline Rich AKT Substrate of 40kDa</i>
PRR5	<i>Proline Rich 5</i>
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin Homolog</i>
RAPTOR	<i>Regulatory-Associated Protein of mTOR</i>
R-FC	<i>Rituximab, Fludarabine, Cyclophosphamide</i>
RICTOR	<i>Rapamycin-Insensitive Companion of mTOR</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RPS6	<i>Ribosomal Protein S6</i>

S6K	<i>ribosomal protein S6 Kinase, 70kDa, polypeptide 1</i>
SF3B1	<i>Splicing Factor 3B subunit 1</i>
SIN1	<i>mitogen-activated protein kinase associated protein 1</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SOX11	<i>Sex determining region Y-box 11</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
SYK	<i>Spleen tyrosine kinase</i>
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i>
TSC1/2	<i>Tuberous Sclerosis protein 1/2</i>
U-CLL	<i>Unmutated-CLL</i>
ULK	<i>UNC51-Like autophagy activating Kinase</i>
VDJ	<i>Variable, Diversity, Join</i>
VEGFA	<i>Vascular Endothelial Growth Factor A</i>
VPS34	<i>Vacuolar Protein Sorting 34</i>
ZAP70	<i>Zeta-Associated Protein of 70 KDa</i>
$\Delta\Psi_m$	<i>Pèrdua de potencial de membrana mitocondrial</i>



Introducció

A finals del 1800, el científic alemany Paul Ehrlich va començar la recerca de la “bala màgica”, un fàrmac selectiu amb afinitat pels microorganismes patogènics sense afectació de la cèl·lula hoste. El desenvolupament d'aquesta idea el va portar a la síntesi del primer fàrmac efectiu contra la sífilis, el Salvarsan, i al que es considera el naixement de la quimioteràpia.¹ Més de 100 anys després, la idea de trobar un fàrmac específic i dirigit contra una diana concreta segueix inspirant la investigació científica de nous fàrmacs.

En l'àmbit de l'oncologia, el concepte de la bala màgica és aplicable a aquella teràpia dirigida contra les cèl·lules tumorals que deixa intactes les cèl·lules normals de l'organisme. Imatinib (Gleevec), un fàrmac dirigit contra la cinasa BCR/ABL (*Breakpoint Cluster Region/c-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase*) de la leucèmia mieloide crònica, n'és l'exemple més paradigmàtic.² Malgrat tot, bona part de les aproximacions terapèutiques contra el càncer no són bales màgiques sinó que afecten tant a les cèl·lules malignes com a les normals.

Amb els grans avenços tecnològics i la gran quantitat d'informació obtinguda dels estudis genòmics però, s'està accelerant la convergència del descobriment científic a l'aplicació clínica. El gran potencial d'aquestes noves eines requereix també d'un bon coneixement de la rellevància biològica de les alteracions genòmiques, amb estudis funcionals i mecanístics. Amb l'ajut de les noves tècniques de la biologia, però també amb la intuïció, la serendipitat i les proves empíriques, que probablement sempre tindran un paper en la ciència, es continua treballant en el desenvolupament de noves teràpies dirigides contra el càncer.

1. Neoplàsies limfoides de cèl·lula B

Les neoplàsies limfoides de cèl·lula B són un grup molt heterogeni de tumors, amb afectació dels limfòcits B madurs i manifestació en ÒRGANS LIMFOIDES SECUNDARIS o TEIXITS EXTRANODALS. Aquest terme engloba a més de 30 entitats clíniques diferents,³ entre elles el limfoma de cèl·lules del mantell (MCL; *Mantle Cell Lymphoma*) i la leucèmia limfàtica crònica (CLL; *Chronic Lymphocytic Leukemia*). La diversitat de limfomes es correspon als diferents estadis de desenvolupament i diferenciació dels limfòcits B, a la particular estructura del seu receptor (BCR; *B-Cell Receptor*) i a la presència de translocacions cromosòmiques específiques. Aquesta heterogeneïtat inherent de les neoplàsies limfoides repercuteix en comportaments clínics molt variats i per tant, es requereixen estratègies terapèutiques molt diverses, cada vegada més flexibles i adaptades a les característiques dels diferents grups de pacients.⁴

1.1. El limfoma de cèl·lules del mantell

Introducció

El MCL, definit com a entitat pròpia a principis dels 90s,^{5;6} es caracteritza per una proliferació anòmala de limfòcits B madurs amb tendència a la disseminació. Els pacients presenten limfadenopatia –augment de mida dels ganglis– generalitzada (90%), infiltració del moll de l'os (60-75%), esplenomegàlia (55%), hepatomegàlia (35%), afectació gastrointestinal (25%) i patró leucemitzat, és a dir, presència tumoral en sang perifèrica.^{7;8} La incidència anual a Europa és de 0.45 casos /100.000 persones⁹ i la mitjana d'edat al diagnòstic és de 60 anys aproximadament.¹⁰ Encara que la quimioteràpia convencional indueix alts índexs de remissió en pacients no tractats prèviament, la majoria acaben recaient, contribuint a la curta mitjana de supervivència de 5-7 anys.^{11;12} Avui dia, el MCL és considera una malaltia incurable.

ÒRGANS LIMFOIDES SECUNDARIS
Zones on es produeix la diferenciació dels limfòcits B induïda per l'antigen. Inclou els ganglis limfàtics, la melsa i els teixits limfoides associats a mucoses.

TEIXITS EXTRANODALS
Teixits no limfoides on pot haver afectació dels limfòcits B, com ara la pell, el cervell o els pulmons.

Diagnòstic

El diagnòstic de la malaltia es basa en l'immunofenotip i la morfologia de la malaltia. El fenotip del MCL consisteix en l'expressió de les immunoglobulines de superfície IgM/IgD, els antígens associats al limfòcit B (CD20, CD22, CD79), l'antigen associat a la cèl·lula T CD5 i FMC7. En canvi, no expressen el marcador d'activació i creixement dels limfòcits B CD23. Morfològicament, s'han descrit variants clàssiques i blastoides del tumor, aquesta última associada amb un pitjor pronòstic (Figura 1).

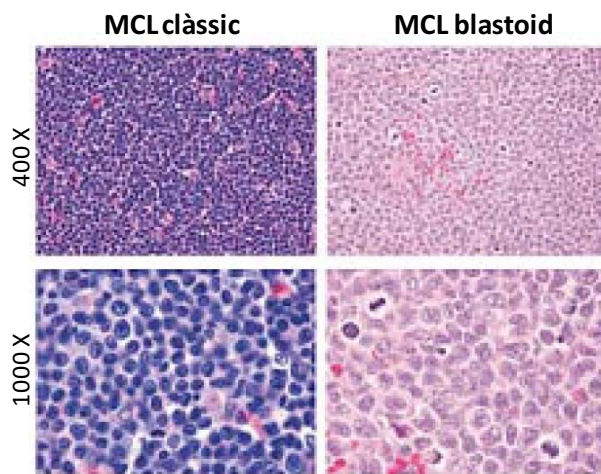


Figura 1 | Variants morfològiques del MCL. Classificació del MCL en les seves variants clàssica i blastoid a partir de la histologia d'una biòpsia de gangli limfàtic.¹³

El MCL està genèticament caracteritzat per la translocació cromosòmica $t(11;14)(q13;q32)$, que juxtaposa el protooncògen *CCND1* (ciclina D1) sota el control del promotor del gen de la cadena pesada de les immunoglobulines. Com a conseqüència, la ciclina D1, no expressada en limfòcits normals, es troba constitutivament sobreexpressada i provoca una alteració del cicle cel·lular en fase G_1/S . La detecció de la translocació per la tècnica citogenètica FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) o bé la sobreexpressió de ciclina D1 per immunohistoquímica, són complements útils per al diagnòstic de la malaltia.^{10;13}

Origen del MCL

La translocació inicial $t(11;14)(q13;q32)$ del MCL succeeix a l'estadi de diferenciació dels precursors de cèl·lula B al moll de l'os. En aquest estadi, es produeix la recombinació dels segments V(D)J (*Variable, Diversity, Join*) de la regió variable de la cadena pesada del gen de les immunoglobulines (*IGHV; Immunoglobulin Heavy chain Variable region*).

En canvi, el MCL està format per una població específica de limfòcits B madurs, indicant que el fenotip neoplàstic complet és adquirit en fases més tardanes en el procés de diferenciació dels limfòcits B, una vegada ja han deixat el moll de l'os i han migrat als teixits limfoides perifèrics. Mentre que la majoria de casos de MCL es creu que deriven de cèl·lules B CD5⁺ NAÏVE localitzades a la zona del mantell dels FOL·LICLES LIMFOIDES, un 15-40% de casos contenen mutacions en el gen de les immunoglobulines.^{14;15} El procés d'hipermutació somàtica succeeix en els centres germinals dels fol·licles en resposta a l'estimulació per un antigen extern i permet generar anticossos amb una elevada afinitat per l'antigen. Per tant, en absència de mutacions (*IGHV* no mutat), el MCL podria derivar de limfòcits B madurs i *naïve*, mentre que els casos amb mutacions somàtiques (*IGHV* mutat) podrien derivar del centre germinal com a conseqüència d'una resposta a l'antigen (Figura 2).

Curs clínic: MCL no nodal

Clàssicament, el MCL s'ha considerat un limfoma molt agressiu. En canvi, diferents estudis han identificat un conjunt de pacients amb una evolució més indolent de la malaltia, amb una major supervivència, fins i tot en absència de quimioteràpia. A diferència dels casos convencionals de MCL, aquest subgrup de pacients estan caracteritzats per un patró predominantment leucemitzat, mínima afectació ganglionar, baix índex de proliferació, poques alteracions cromosòmiques, *IGHV* mutat i absència de l'expressió de *SOX11* (*Sex determining region Y-box 11*).¹⁶⁻¹⁸ Alguns d'aquests pacients però, poden acabar progressant cap a una forma més agressiva de la malaltia, amb adquisició d'alteracions cromosòmiques com la deleció de 17p i extensa afectació nodal (Figura 2).^{17;19}

LIMFÒCITS B NAÏVE

Limfòcits que no han estat exposats a cap antigen.

FOL·LICLE LIMFOIDE

Agregats limfoides en els teixits on els limfòcits B són estimulats pels antígens i el microambient per generar anticossos d'elevada afinitat.

SOX11

Factor de transcripció que contribueix a la diferenciació dels limfòcits B madurs, modulació del cicle cel·lular i l'apoptosi. Marcador de diagnòstic pel MCL convencional.

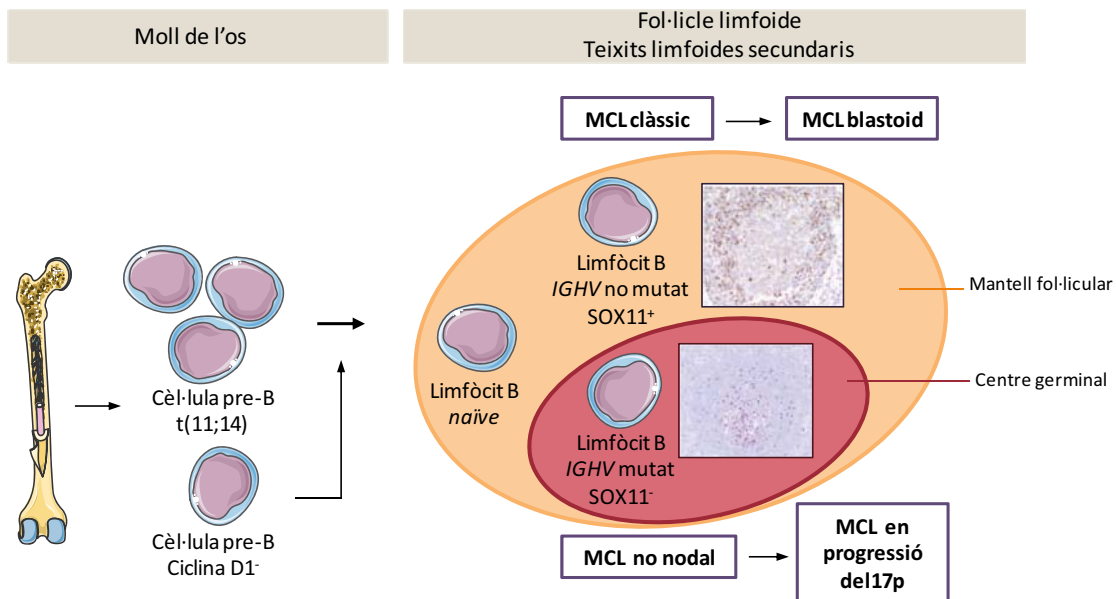


Figura 2 | Hipotètic model de l'origen del MCL i dels seus subtipus moleculars. Els limfòcits B *naïve* amb la t(11;14) s'originen al moll de l'os i colonitzen la zona del mantell dels fol·licles limfoides. Expressen SOX11, *IGHV* no mutat o mínimament mutat, són genèticament inestables i tendeixen a acumular alteracions genètiques addicionals amb les quals augmenta l'agressivitat de la malaltia. Alternativament, alguns limfòcits amb la t(11;14) entren al centre germinal i presenten hipermutacions somàtiques en *IGHV*. Aquestes cèl·lules són genèticament estables, no presenten SOX11 i tendeixen a disseminar-se per la sang perifèrica més que no pas als ganglis limfàtics. La malaltia pot mantenir-se estable per llargs períodes de temps, però l'adquisició de mutacions com la del 17p comporta la progressió de la malaltia. Alguns tumors amb les característiques del MCL no tenen la translocació.²⁰

El rol de la ciclina D1 en MCL

La translocació t(11;14)(q13;q32) és considerada el primer esdeveniment oncogènic en el desenvolupament del MCL. Addicionalment a aquesta translocació però, s'han observat altres mecanismes que augmenten l'expressió de ciclina D1 en MCL, com ara alteracions en el transcrit de la ciclina D1 que augmenten la seva estabilitat²¹ o amplificacions de l'al·lel translocat.²² A part de la seva implicació en el control del cicle cel·lular, la ciclina D1 podria tenir efectes oncogènics addicionals, tot i que el seu paper en el MCL encara no es coneix bé.²³⁻²⁶

- MCL ciclina D1 negatiu. L'existència de casos de MCL amb absència de ciclina D1 però amb la típica morfologia i perfil d'expressió gènica, suggereix que la

sobreexpressió de ciclina D1 no és la única mutació que podria iniciar el desenvolupament del MCL. Aquests casos sovint sobreexpressen ciclina D2.^{27;28} La detecció de SOX11 tant en MCL ciclina D1 positius com en ciclina D1 negatius,²⁹ fan d'aquesta proteïna un marcador útil per al diagnòstic, a part de suggerir un possible rol en la patogènesi de la malaltia.

Vies de senyalització alterades en MCL

La sobreexpressió de la ciclina D1 sembla no ser suficient per causar la transformació cel·lular ni per explicar el comportament habitualment agressiu del MCL. Moltes altres alteracions secundàries que involucren gens de vies de senyalització com el cicle cel·lular, resposta al dany del DNA i vies de supervivència, es troben freqüentment en els casos més agressius de MCL (Taula 1).

- Cicle cel·lular. Les dues principals vies de senyalització implicades en el control del cicle cel·lular, p16^{INK4a}/CDK4 (*Cyclin-Dependent Kinase 4*)/RB1 (*Retinoblastoma 1*) i p14^{ARF}/MDM2 (*Mouse Double Minute 2 homolog*)/p53, es troben freqüentment alterades. Delecions del locus de *CDKN2A* (*Cyclin Dependent Kinase inhibitor 2A*, que codifica per p16^{INK4a} i p14^{ARF}), mutacions inactivadores o delecions de *TP53* i *RB1*, o amplificacions de *CDK4* i *MDM2*, són habituals en el MCL.³⁰⁻³²
- Vies de resposta al dany del DNA. Mutacions i delecions en el gen *ATM* (*Ataxia Telangiectasia-Mutated*) són habituals en pacients amb elevada inestabilitat genòmica.³³ Ocasionalment, també s'han observat alteracions en dues cinases que actuen per sota d'ATM en la mateixa via de senyalització cel·lular, CHK1 i CHK2 (*Checkpoint Kinase 1-2*), i que prevenen l'activació del cicle cel·lular en resposta al dany del DNA.³⁴ També s'han descrit mutacions en gens que regulen la modificació de la cromatina, com és el cas de *WHSC1* (*Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1*), *MLL2* (*Lysine (K)-specific methyltransferase*) i *MEF2B* (*Myocyte Enhancer Factor 2B*), la implicació funcional de les quals encara no és coneguda.³⁵

Taula 1 | Selecció d'alteracions genòmiques recurrents en el MCL

Gen	Classe/Producte	Funció	Lesió
Cicle cel·lular			
CCND1	Ciclina D1	Forma un complex amb CDK4/CDK6 per regular la transició G ₁ /S a través de la fosforilació de retinoblastoma	+
CDK4	Cinasa dependent de ciclina	Forma un complex amb la ciclina D1 per regular la fase més primerenca de G ₁	+
MDM2	Regulador negatiu de p53	Indueix la degradació de p53 pel proteasoma	+
RB1	Supressor de tumors	S'uneix al factor de transcripció E2F evitant la seva translocació al nucli i la progressió del cicle cel·lular	-
CDKN2A	p14 i p16	Inhibeixen l'activitat dels complexos CDK/Ciclina D a la fase G ₁	-
Resposta al dany del DNA/moduladors de la cromatina			
TP53	Supressor de tumors	Indueix parada del cicle cel·lular, apoptosi i senescència	-
ATM	Cinasa reguladora dels punts de control del cicle cel·lular	Com a resposta al dany del DNA, ATM regula els punts de control de les fases G ₁ /S i G ₂ /M del cicle cel·lular, mitjançant la fosforilació de p53, MDM2 i CHK2.	-
WHSC1 MLL2 MEF2B	Modificadors de la cromatina	Histones metiltransferases, reguladors de l'expressió gènica.	-
Vies de supervivència cel·lular			
SYK	Tirosina cinasa del BCR	Propaga la senyalització del BCR mitjançant l'activació de les vies NFκB, PI3K, MAPK i PLCγ	+
PIK3CA	Subunitat catalítica de PI3K (p110α)	Implicada en la senyalització tònica del BCR, produeix fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfats i facilita l'activació d'AKT	+
PTEN	Fosfatasa reguladora de PI3K	Antagonitza l'activitat de PI3K catalitzant la reacció contrària per formar fosfatidilinositol-4,5-bifosfats	-
BIRC3	Regulador negatiu de la via de NFκB	Inhibeix l'activitat de MAP3K14, un cinasa activadora de la via de NFκB	-
NOTCH1/2	Membres de la família NOTCH	Regulació del desenvolupament i la supervivència cel·lular.	-
Apoptosi			
BCL2	Regulador antiapoptòtic	Promou la supervivència cel·lular mitjançant la seva unió als membres proapoptòtics BAX i BAK	+
BCL2L11	BIM	S'uneix als membres antiapoptòtics BCL2, BCLXL i MCL1 i facilita l'activació de l'apoptosi	-
Interacció amb el microambient			
TLR2	Membre de la família TLR	Rol en el reconeixement de patògens i producció de citocines per a la immunitat innata	-
+ indica amplificació; - deleció/mutació.			
Abreviacions: CHK2, <i>Checkpoint Kinase 2</i> ; BCR, <i>B-Cell Receptor</i> ; NFκB, <i>Nuclear Factor kappa B</i> ; PI3K, <i>Phosphatidylinositol 3-Kinase</i> ; MAPK, <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i> ; PLCγ, <i>Phospholipase C gamma</i> ; AKT, <i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i> ; MAP3K14, <i>Mitogen-Activated Protein kinase kinase kinase 14</i> ; BAX, <i>BCL2-Associated X protein</i> ; BAK, <i>BCL2-Antagonist/Killer 1</i> ; BCLXL, <i>BCL2-like 1</i> ; MCL1, <i>Myeloid Cell Leukemia 1</i> ; TLR, <i>Toll-Like Receptor</i> .			

- Vies de supervivència cel·lular. Amplificacions i sobreexpressions de gens antiapoptòtics com ara *BCL2 (B-cell CLL/lymphoma 2)*²² i delecions homozigotes de gens proapoptòtics com ara *BCL2L11 (BCL2-like 11, gen que codifica per la proteïna BIM)* han estat descrits en tumors primaris.³⁶ El rol de la deleción de *BIM* en la patogènesi del MCL ha estat recentment avaluat en un model murí.³⁷ També s'han descrit mutacions de *BIRC3 (Baculoviral IAP Repeat Containing 3)*, *NOTCH1* i *NOTCH2*,^{35,38} activacions constitutives de les vies de PI3K (*Phosphatidylinositol-3-Kinase*)/AKT/mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) i via canònica de WNT³⁹.
- Vies implicades en la interacció amb el microambient. Les cèl·lules canceroses únicament no són capaces de generar la malaltia, sinó que requereixen de la interacció amb altres cèl·lules que contribueixen al suport i a la progressió del tumor. Les cèl·lules de MCL entren en apoptosi espontània *in vitro*, el que exemplifica que hi ha factors essencials per la proliferació i supervivència d'aquestes cèl·lules que no són intrínscics de la cèl·lula de MCL. A més a més, la majoria de pacients de MCL presenten manifestacions extranodals, de manera que els factors microambientals podrien promoure la disseminació del tumor. Finalment, el fet que alguns MCLs tinguin mutacions en *IGHV*, contribueix a la hipòtesi que el centre germinal fol·licular pot representar un nínxol on les cèl·lules tumorals entrin en contacte amb cèl·lules accessòries, com ara MSCs (*Mesenchymal Stromal Cells*),⁴⁰ FDCs (*Follicular Dendritic Cells*),^{41,42} macròfags i limfòcits T.⁴³

Tot i que la influència del microambient en la patogènesi del MCL encara no és del tot coneguda, s'han descrit activacions de vies de supervivència interrelacionades amb l'estroma tumoral, com ara la senyalització del BCR⁴⁴ i la via JAK/STAT (*Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription*)⁴⁵, i la participació de diverses citocines com ara BAFF (*B-cell Activating Factor*),⁴⁰ IL6⁴⁶ o CD40L⁴⁷ (liligand expressat en els limfòcits T, la seva unió al receptor CD40 permet la interacció amb les cèl·lules de MCL). Recentment, s'han trobat mutacions de *TLR2 (Toll-Like Receptor 2)*, associades a una major producció d'interleucines, el que promou la supervivència i expansió de les cèl·lules tumorals.³⁵ A més a més, s'ha descrit que

les cèl·lules de MCL expressen alts nivells de CXCR4 (*chemokine C-X-C motif Receptor 4*), CXCR5 (*chemokine C-X-C motif Receptor 5*) i VLA-4 (CD49d) (*Very Late Antigen-4*), molècules implicades en els processos de migració i adhesió cel·lulars,⁴⁸ el que exemplifica la importància de les interaccions amb el microambient per a la progressió tumoral i la resistència a fàrmacs.

Pronòstic

El millor predictor de la supervivència és la proliferació del tumor, de manera que una proliferació tumoral elevada s'associa amb una pitjor supervivència. L'expressió de Ki-67⁴⁹ o l'ús d'una signatura gènica de proliferació⁵⁰ han esdevingut bons marcadors de proliferació per preveure la supervivència dels pacients de MCL. Això remarca la importància de l'alteració del cycle cel·lular en el comportament del MCL. El valor pronòstic d'altres factors biològics com l'estat mutacional de *IGHV* no ha estat confirmat.

Tractaments actuals

Els règims de quimioteràpia en el MCL són els mateixos utilitzats per a d'altres tipus de limfomes i principalment es basen en CHOP, normalment en combinació amb RITUXIMAB. Règims de quimioteràpia més intensius com ara HYPER-CVAD o bé el transplantament de progenitors hematopoètics en pacients candidats (depenent de l'edat i l'estat general del pacient) són altres aproximacions que es realitzen en primera línia. El major coneixement en els mecanismes biològics implicats en la patogènesi del MCL ha permès la introducció de nous tractaments, especialment per a pacients refractaris o en recaiguda. Dels acceptats per a ús clínic, els que han obtingut respostes més consistents són ibrutinib (inhibidor de BTK; *Bruton Tyrosine Kinase*), amb un índex de resposta global (ORR; *Overall Response Rate*) del 65-68%,⁵¹ bortezomib (inhibidor del

CHOP
Règim de quimioteràpia estàndard basat en l'ús de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina i prednisona.

RITUXIMAB
Anticòs monoclonal dirigit contra l'antigen CD20, present en limfòcits B normals i en la majoria de neoplàsies de cèl·lula B.

HYPER-CVAD
Règim intensiu de quimioteràpia basat en R-CHOP però incloent elevades dosis de metotrexat i citarabina.

PROTEASOMA), 30-50%,⁵² temsirolimus (un inhibidor de mTORC1), 22-41%,^{53;54} i lenalidomida (un agent immunomodulador), 35-63%.^{55;56}

1.2. La leucèmia limfàtica crònica

Introducció

La CLL és el tipus de leucèmia més comú en adults,⁵⁷ afectant aproximadament a 4 persones de cada 100.000 als Estats Units.⁵⁸ Està caracteritzada per l'acumulació de limfòcits B madurs, de llarga vida mitja i baixa capacitat proliferativa, en sang perifèrica, moll de l'os, nòduls limfàtics o altres teixits limfoides.⁵⁹ Tot i això, una petita fracció de cèl·lules situada als centres proliferatius o PSEUDOFOL·LICLES té activitat proliferativa i genera aproximadament un 2% de cèl·lules noves de CLL cada dia.⁶⁰ La mitjana d'edat al diagnòstic és d'aproximadament 72 anys.⁶¹ És una malaltia molt heterogènia amb un curs clínic molt variable.

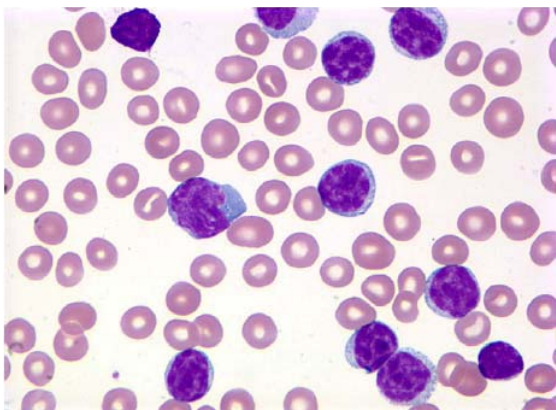


Figura 3 | Sang perifèrica d'un pacient amb CLL (1000 X d'augment).⁶²

Diagnòstic

El diagnòstic es basa en el recompte en sang de l'expansió clonal de limfòcits B ($\geq 5000/\mu\text{l}$ durant almenys 3 mesos) i en la caracterització del seu immunofenotip aberrant (Figura 3). El fenotip de la CLL es defineix per la coexpressió de CD5, els antígens de superfície de limfòcits B CD19, CD20 i CD23 i una baixa expressió de les immunoglobulines de superfície.^{63;64}

PROTEASOMA
Complex proteic responsable de la degradació de proteïnes solubles.

PSEUDOFOL·LICLES
Estructures específiques localitzades als nòduls limfàtics i al moll de l'os que contenen cèl·lules de CLL amb activitat proliferativa, limfòcits T i cèl·lules estromals.

Origen de la CLL

El 60-65% de casos de CLL són *IGHV* mutades (M-CLL; *Mutated-CLL*), amb evidència d'HIPERMUTACIONS SOMÀTIQUES, mentre que el 35-40% restant, no presenten mutacions (U-CLL; *Unmutated-CLL*).⁶⁵ En canvi, estudis d'expressió gènica entre M-CLL i U-CLL revelen que aquestes dues categories de CLL comparteixen un patró molt similar, amb excepció de gens com *ZAP70* (*Zeta-Associated Protein of 70 KDa*), suggerint que ambdues derivarien de progenitors de cèl·lules B que han tingut algun contacte amb l'antigen.⁶⁶ El paper de l'estimulació antigènica queda corroborat amb l'observació que certs gens de *IGHV* s'utilitzen amb una freqüència més elevada de l'esperada,^{65;67} amb un 30% de les CLL compartint elevats graus d'homologia dels seus BCR (BCR estereotipats).⁶⁸ Tot això indica que certs tipus de reordenaments del BCR han estat positivament seleccionats per les seves interaccions amb antígens específics i que per tant, aquesta experiència antigènica contribueix a la patogènesi de la CLL. L'origen cel·lular de la CLL però, és encara molt controvertit. Recentment, en un estudi epigenòmic, s'ha identificat que les diferències en el perfil de metilació de U-CLL i M-CLL poden ser atribuïdes als diferents tipus de subpoblacions de cèl·lula B. Així, U-CLL tindria un perfil més similar a les cèl·lules *naïve* i les cèl·lules CD5⁺ que no han passat pel centre germinal, mentre que M-CLL seria més similar a les CÈL·LULES B MEMÒRIA (Figura 4).⁶⁹

Curs clínic

La majoria de casos de CLL estan precedits per una limfocitosi monoclonal de cèl·lula B (MBL; *Monoclonal B cell Lymphocytosis*), una expansió indolent de limfòcits B monoclonals (<5000/μl) en sang perifèrica, sense limfadenopaties.⁷⁰ Clínicament, la CLL està marcada per un elevat grau d'heterogeneïtat, amb pacients asimptomàtics, elevada estabilitat de la malaltia i una supervivència mitja pràcticament normal i d'altres que progressen ràpidament, amb una supervivència de pocs mesos després del diagnòstic.⁷¹

HIPERMUTACIÓ SOMÀTICA
Procés que succeeix al centre germinal i que permet modificar l'afinitat del BCR per l'antigen mitjançant mutacions als gens de les immunoglobulines.

CÈL·LULA B MEMÒRIA
Cèl·lula B que ha tingut contacte amb l'antigen i que expressa anticossos d'elevada afinitat. Respon ràpidament davant d'una segona exposició a l'antigen.

Una fracció de casos de CLL (un 15% als 10 anys del diagnòstic de CLL) pot transformar-se en una forma molt més agressiva anomenada Síndrome de Richter.⁷²

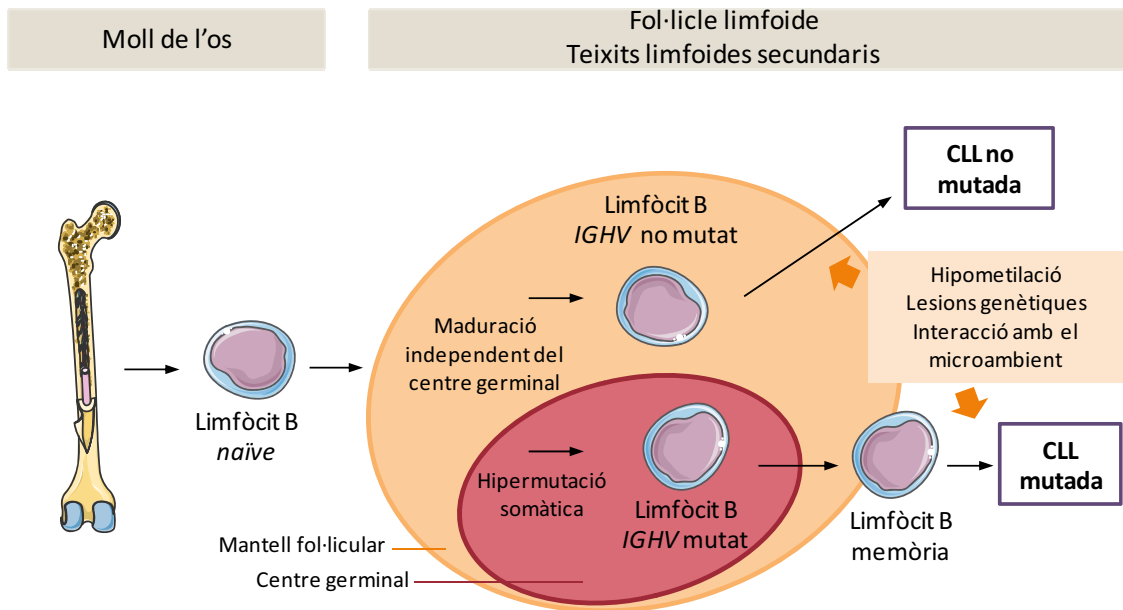


Figura 4 | Hipotètic model de l'origen de la CLL i dels seus subtipus moleculars. La trobada entre l'antigen i el limfòcit B *naïve* pot succeir de forma depenent de limfòcit T en el centre germinal, on es produeix la hipermutació somàtica en els gens de *IGHV*, o de forma independent del limfòcit T. Les CLL *IGHV* no mutades semblen derivar dels limfòcits B que no han passat pel centre germinal, mentre que les CLL *IGHV* mutades, podrien derivar dels limfòcits B memòria. En tots dos casos, l'acumulació de lesions genètiques, reprogramació epigenètica i interaccions amb el microambient afavoririen la transformació tumoral.

El genoma de la CLL

Alteracions citogenètiques. La deleció del13q14 és l'alteració més freqüent i succeeix en el 50-60% dels casos.⁷³ Podria ser una de les lesions més primerenques de la malaltia, ja que s'ha trobat en una freqüència similar en la MBL i perquè sovint és la única lesió detectada.⁷⁴ Aquesta alteració comporta la deleció dels gens *DLEU1* i *DLEU2*⁷⁵ que codifiquen pels microRNAs *MIR15A* i *MIR16A*. Aquesta deleció afavoreix l'expressió de *MCL1* (*Myeloid Cell Leukemia 1*) i *BCL2*, contribuint al desenvolupament de la malaltia.^{76;77}

Altres alteracions genètiques en la CLL inclouen la trisomia 12 (15% dels casos),⁷³ la deleció del11q22-q23, que majoritàriament afecta el gen *ATM* (15% dels casos)

causant inestabilitat genòmica, i la deleció del17p13 (5-10%) que altera la funció del gen supressor de tumors *TP53*.⁷³ Sovint, les deleccions del11q22-q23 i del17p13 van acompanyades d'inactivació del segon al·lel d'*ATM* i de *TP53*, respectivament, per mutacions puntuals (Taula 2).^{78;79}

Taula 2 | Selecció d'alteracions genètiques recurrents en CLL

Alteració	Freqüència (%)	Efecte
Alteracions citogenètiques		
Deleció de 13q14	50-60	Supressió de <i>MIR15A</i> i <i>MIR16A</i>
Trisomia 12	15	Desconegut
Deleció 11q22-q23	15	Inactivació d' <i>ATM</i>
Deleció 17p13	5-10	Inactivació de p53
Alteracions genòmiques		
Mutació de <i>NOTCH1</i>	10	Activació de la via de <i>NOTCH1</i>
Mutació de <i>SF3B1</i>	5-10	Regulació del <i>splicing</i> alternatiu
Inactivació de <i>BIRC3</i>	4	Activació de la via de NFκB
Mutació de <i>MYD88</i>	3-5	Activació de la via de TLR
Mutació de <i>POT1</i>	3.5	Alteració de la integritat dels telòmers i inestabilitat cromosòmica
Abreviacions: <i>ATM</i> , <i>Ataxia Telangiectasia-Mutated</i> ; <i>SF3B1</i> , <i>Splicing Factor 3B subunit 1</i> ; <i>BIRC3</i> , <i>Baculoviral IAP Repeat Containing 3</i> ; NFκB, <i>Nuclear Factor Kappa B</i> ; <i>MYD88</i> , <i>Myeloid Differentiation primary response gene 88</i> , TLR; <i>Toll-Like Receptor</i> ; <i>POT1</i> , <i>Protection Of Telomeres 1</i> .		

Alteracions genòmiques. La recent seqüenciació del genoma de la CLL ha permès identificar altres lesions genètiques recurrents, entre les quals s'inclou *NOTCH1*, *SF3B1* (*Splicing Factor 3B subunit 1*), *BIRC3* i *MYD88* (*Myeloid Differentiation primary response gene 88*). La mutació activadora de *NOTCH1* (10% en el diagnòstic) succeeix preferentment en U-CLL i sovint es troba associada a la trisomia 12, essent un subgrup de pacients d'alt risc i amb poca supervivència, comparable al subgrup amb alteracions de *TP53* i amb una elevada probabilitat de desenvolupar Síndrome de Richter.^{80;81} El gen *SF3B1* (5-10%) és un regulador del *splicing* alternatiu⁸² i la inactivació de *BIRC3* (4%) causa l'activació constitutiva de la via de NFκB (*Nuclear Factor Kappa B*).⁸³ Finalment, s'han descrit mutacions en altres gens però que es troben en freqüències

molt baixes, com ara *MYD88* (3-5%), una molècula adaptadora del complex TLR (*Toll-Like Receptor*),^{80;84} o *POT1* (*Protection Of Telomeres 1*) (3.5%), que codifica per un component del complex de les *shelterines*, reguladors crítics de la integritat dels telòmers (Taula 2).⁸⁵

Alteracions epigenètiques. A diferència del baix nombre de mutacions recurrents amb elevada freqüència que s'han descrit en la CLL, un gran nombre de gens es troba epigenèticament alterat, predominantment en forma d'hipometilació. Aquestes alteracions afecten majoritàriament les regions potenciadores dels gens i només un 5-10% dels gens mostra correlació entre la metilació del DNA i l'expressió gènica.⁶⁹ Aparentment, això suggereix que la regulació gènica podria no ser el paper principal de la metilació del DNA. Recentment, s'ha hipotetitzat que la metilació podria tenir un procés essencial en el procés leucemogènic abans de la detecció clínica de la CLL (Figura 4).⁸⁶

Pronòstic

Estadiatge de la CLL. Els sistemes de estadiatge de Rai i Binet són importants pel pronòstic i per les decisions del tractament. La classificació de Rai es basa en el grau de manifestació de la malaltia,⁸⁷ mentre que el sistema de Binet té en compte les àrees afectades per la malaltia.⁸⁸ Un estadiatge avançat en el moment del diagnòstic és indicatiu de mal pronòstic.

Marcadors sèrics. Nivells elevats en sèrum de la microglobulina- β 2, timidina cinasa, CD23 soluble i TNF (*Tumor Necrosis Factor*), són indicatius de mal pronòstic.⁸⁹

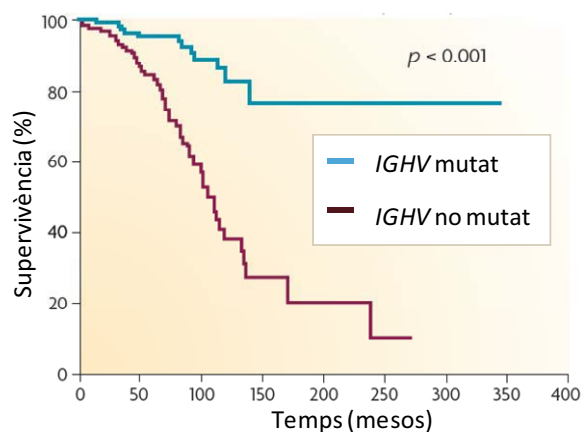


Figura 5 | Pronòstic de la CLL segons l'estat mutacional del gen de les immunoglobulines.⁹⁰

Alteracions genètiques. A diferència del MCL, la distinció entre els casos M-CLL i U-CLL és clínicament rellevant ja que *IGHV* no mutat és un predictor de mal pronòstic (Figura 5).⁹¹ La separació entre aquests dos subgrups s'ha establert de forma arbitrària al 98% d'homologia de seqüència de les *IGHV* de la CLL amb les còpies germinals.⁹²

A més a més, els casos U-CLL sovint van acompanyats d'altres alteracions genètiques que confereixen major agressivitat al curs de la malaltia, com ara elevada expressió de ZAP70 (>20%)⁹³ i CD38 (>30%).⁹⁴ També són predictores d'un pitjor pronòstic les alteracions de *TP53*⁷⁹ i *ATM*,⁷³ mutacions de *NOTCH1*^{81;95} i *SF3B1*⁸² i inactivació de *BIRC3* (Figura 6).⁸³

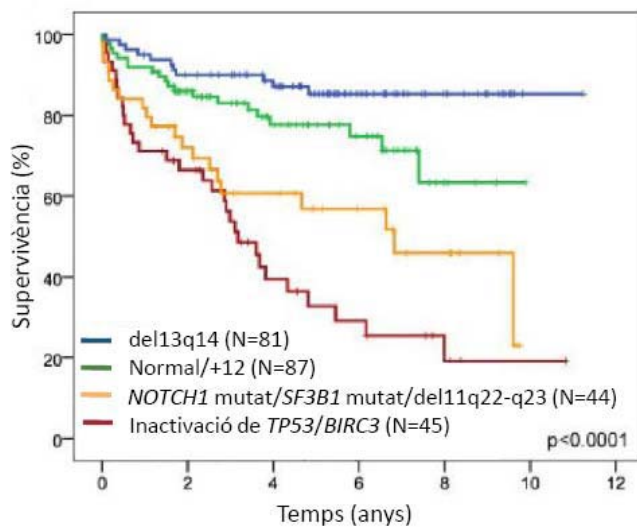


Figura 6 | Pronòstic de la CLL segons la integració del model mutacional i citogenètic.⁹⁶

La progressió de la CLL cap a Síndrome de Richter està associada a l'adquisició de certes alteracions que contribuirien a la transformació tumoral, com són alteracions de *TP53* (50-60%), activació de *NOTCH1* (30%) i *MYC* (20%).⁹⁷

Impacte del microambient en la CLL

La CLL té una particular dependència del microambient (Figura 7). Entre les diferents neoplàsies de tipus B, la CLL és la malaltia que respon millor als inhibidors de la senyalització del BCR, el qual té un paper central en el diàleg amb les cèl·lules estromals, el que ressalta la importància del microambient en aquesta malaltia.⁹⁸

ZAP70

És una tirosina cinasa clau per la senyalització del receptor dels limfòcits T, tot i que també juga un paper en la transducció de senyals del BCR. La seva expressió sembla estable amb el temps.

CD38

És un marcador de superfície associat amb la proliferació de les CLL. La seva expressió no és estable amb el temps.

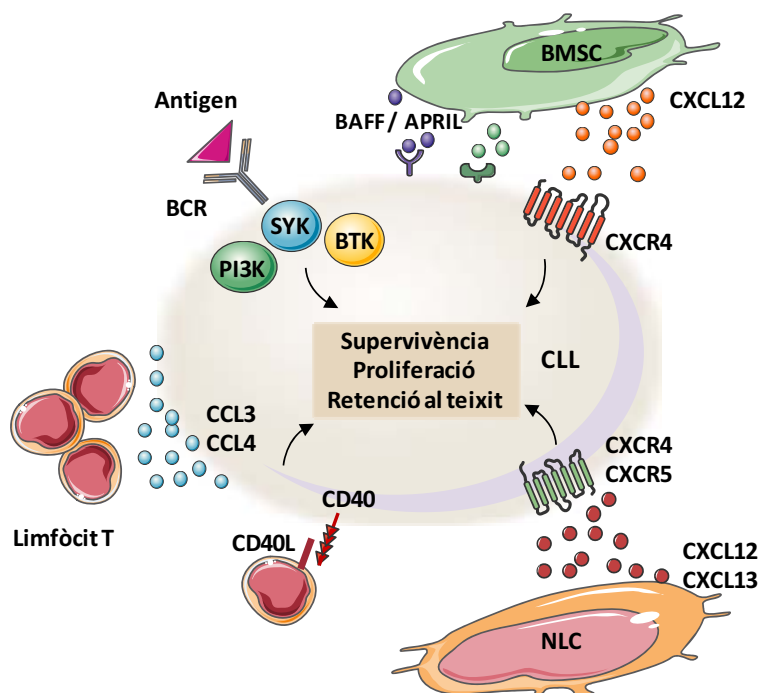


Figura 7 | El microambient de la CLL. Les cèl·lules de CLL interactuen amb cèl·lules estromals com les BMSC (*Bone Marrow Stromal Cells*) i les NLCs (*Monocyte-derived Nurse-Like cells*) a través de receptors de quimiocines i molècules d'adhesió. NLCs expressen BAFF, APRIL, CXCL12 i CXCL13, mentre que BMSC principalment secreta CXCL12. L'activació del BCR en les cèl·lules de CLL causa la secreció de les quimiocines CCL3 i CCL4 que són potents atractants dels limfòcits T. Els limfòcits T interactuen amb les cèl·lules de CLL a través de l'expressió de CD40L i contribueixen a la proliferació i supervivència de les cèl·lules de CLL.

Les interaccions entre cèl·lules tumorals i cèl·lules estromals, mitjançant les quimiocines i les molècules d'adhesió, són crítiques per la migració i retenció de les cèl·lules de CLL en el moll de l'os i en els teixits limfoides secundaris.⁹⁹ En aquests compartiments, el microambient activa les vies del BCR i NFκB en les cèl·lules de CLL, facilitant la proliferació de les cèl·lules tumorals i contribuint a la progressió de la malaltia.¹⁰⁰ Però les cèl·lules de la CLL no són les úniques que es beneficien del contacte amb l'estroma, ja que les cèl·lules estromals també són activades per les cèl·lules de CLL, mitjançant la via de NFκB.¹⁰¹ Les cèl·lules estromals secreten molècules estimuladores com BAFF i APRIL (*A Proliferation-Inducing Ligand*),¹⁰² mitjançant les quals protegeixen les cèl·lules de la CLL de l'apoptosi, o CXCL12 i CXCL13, que interaccionen amb els receptors de quimiocines CXCR4 i CXCR5, respectivament, expressats en les cèl·lules de CLL. Les integrines VLA-4¹⁰³ cooperen amb els receptors de quimiocines en els processos de quimiotaxis, adhesió,

polimerització d'actina i migració de les cèl·lules de CLL a través de l'endoteli vascular.¹⁰⁴ Les cèl·lules de CLL, al seu torn, secreten quimiocines com CCL3 i CCL4, que actuen com a quimioatracients de les cèl·lules T.¹⁰⁵ En els ganglis limfàtics, la interacció entre CD40 expressat en la CLL i el seu lligand CD40L, normalment expressat en els limfòcits T, proporciona senyals antiapoptòtics i de proliferació, resultant en la formació dels pseudofol·licles.¹⁰⁵ Per tant, la CLL no només es beneficia del microambient com un suport per al seu creixement, sinó que a més, participa activament en la complexa intercomunicació amb l'estroma.

Tractaments actuals

La CLL no és necessàriament tractada des del moment del diagnòstic, sinó que depèn de l'estadi clínic o de la presència de malaltia activa i simptomàtica.¹⁰⁶ Durant les últimes dècades, s'ha produït una transició des de les teràpies basades en agents alquilants com el clorambucil o la ciclofosfamida, a les teràpies basades en anàlegs de nucleòsids, com la fludarabina, o a combinacions d'ambdues teràpies. Més recentment, s'ha introduït la immunoquimioteràpia, amb la combinació de règims quimioterapèutics amb anticossos monoclonals com el rituximab o l'ofatumumab (anticossos anti-CD20). La bendamustina, un agent que combina les propietats d'un anàleg de purines i d'un agent alquilant,¹⁰⁷ va ser utilitzada a l'antiga República Democràtica Alemanya, però no va ser fins la reunificació del país que es va donar a conèixer àmpliament la seva significativa activitat clínica i va ser aprovada per la FDA (*American Food and Drug Administration*) l'any 2008.¹⁰⁸ Els tractaments actuals van dirigits a aconseguir remissions de llarga durada, que són definides per una MALALTIA MÍNIMA RESIDUAL negativa. S'han obtingut bons resultats amb el règim fludarabina-ciclofosfamida-rituximab,¹⁰⁹ considerat el tractament estàndard, amb l'anticòs monoclonal alemtuzumab (anticòs anti-CD52, antigen present en limfòcits B i T),¹¹⁰ amb les combinacions fludarabina-ciclofosfamida-mitoxantrona amb o sense rituximab¹¹¹ i bendamustina-rituximab, que al ser molt ben tolerada és un tractament especialment adequat per a pacients grans o amb comorbiditat.¹¹²

MALALTIA MÍNIMA RESIDUAL
Cèl·lules tumorals no detectables que resten en el pacient quan aquest està en remissió després del tractament. Implicades en la recaiguda.

Quimioresistència

Amb les teràpies convencionals però, hi ha un percentatge de pacients que acaben recaient. La predisposició a la quimioresistència està influenciada per la presència d'alteracions genètiques. El cas més dramàtic és el de *TP53*, ja que al voltant del 30-40% dels pacients refractaris a fludarabina tenen delecions o mutacions d'aquest gen.⁵⁷ Precisament els casos amb del17p o *TP53* mutat són candidats per al transplantament al·logènic de cèl·lules mare hematopoètiques.¹¹³ També s'han trobat alteracions en *NOTCH1*, *SF3B1* i *BIRC3* en freqüències més elevades en pacients refractaris a la fludarabina.^{81;83;114;115}

Recentment, s'ha proposat un model en què la quimioteràpia exerceix una pressió que causa la modificació de la freqüència de les diferents mutacions en els diferents subclons de CLL.¹¹⁶ El pacient experimenta una evolució clonal, amb expansió dels clons millor adaptats a la nova situació post-tractament, com podrien ser aquells que presenten mutacions en *TP53*, *SF3B1* i *ATM* (Figura 8).

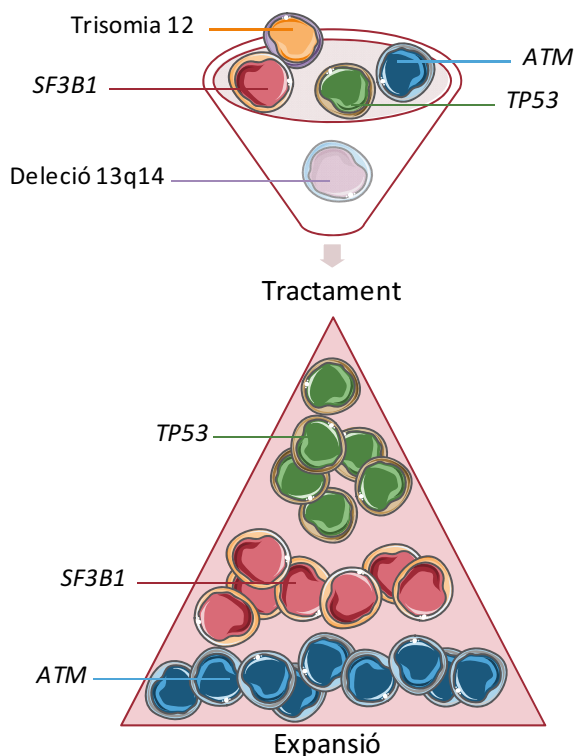


Figura 8 | Efecte del tractament en l'evolució clonal de la CLL. Amb la transformació dels limfòcits B normals a CLL, es produeix una acumulació de mutacions. Com a conseqüència de la pressió exercida pel tractament, determinats clons de CLL s'expandeixen i poden ser responsables de la recaiguda del pacient.

La detecció anticipada d'aquelles mutacions avantatjoses i capaces de provocar la recaiguda dels pacients, i l'aplicació de teràpies personalitzades contra aquestes alteracions específiques, juntament amb la quimioteràpia convencional, minimitzaria el risc de recaigudes.¹¹⁷

Nous fàrmacs en desenvolupament clínic

Queda palesa la necessitat de desenvolupar nous fàrmacs dirigits contra les diferents alteracions específiques de la CLL. Els inhibidors de les cinases del BCR, com ara fostamatinib (inhibidor de SYK; *Spleen tyrosine kinase*),¹¹⁸ ibrutinib (inhibidor de BTK)¹¹⁹ i idelalisib (abans anomenat GS-1101 o CAL-101, inhibidor de PI3K δ)¹²⁰ han demostrat ser particularment efectius. Aquests compostos bloquegen directament els senyals de supervivència i proliferació del BCR. Clínicament, aquests compostos estan caracteritzats per una ràpida redistribució de les cèl·lules tumorals des dels teixits cap a la sang perifèrica, resolent ràpidament la limfadenopatia i l'esplenomegàlia, la qual és acompanyada d'una limfocitosi transitòria.^{118;119} Degut a la limfocitosi, aquests compostos s'estan combinant actualment amb anticossos com rituximab o amb règims de quimioteràpia convencional per aconseguir millors índex de remissions completes.^{103;121-125}

2. Inhibidors de cinases com a estratègia terapèutica en les neoplàsies limfoides de cèl·lula B

L'alteració de l'activitat cinasa ha emergit com un dels principals mecanismes pels quals les cèl·lules canceroses evadeixen les restriccions de proliferació i supervivència que es produeixen en condicions normals. El genoma humà codifica aproximadament per 518 cinases, de manera que pràcticament en qualsevol via de transducció de senyals hi participen cascades de fosforilació. Avui dia, inhibidors d'alguna d'aquestes cinases estan aprovats per al tractament de diferents tipus de neoplàsies, el que evidencia la implicació de les cinases en el procés oncogènic.¹²⁶

2.1. Inhibidors de la senyalització del BCR

La senyalització a través del BCR és bàsica i central per al desenvolupament i la supervivència dels limfòcits B, motiu pel qual no és d'estranyar que la majoria de les neoplàsies limfoides preservin l'expressió del BCR per tal de promoure el seu propi creixement tumoral. L'estimulació antigènica del BCR es tradueix en una complexa xarxa de transducció de senyals en la qual hi participen un gran nombre de cinases. El desenvolupament d'inhibidors específics contra cada una d'aquestes cinases obre diferents possibilitats per tal d'inhibir la senyalització del BCR (Figura 9).⁴

Senyalització del BCR

Tota cèl·lula B normal, i consegüentment, cada cèl·lula B neoplàstica, té un únic BCR que consisteix en una immunoglobulina formada per un parell de cadenes pesades (IgH) i un parell de cadenes lleugeres (IgL). Cada una d'aquestes cadenes té una regió variable (V) única que permet la unió al BCR dels diferents antígens del microambient. Aquesta immunoglobulina està acoblada a un heterodímer de CD79A i CD79B que participa en la transducció de senyals. La unió de l'antigen al BCR desencadena la fosforilació de CD79A/B per la família de cinases SRC, entre les quals s'inclouen les cinases LYN, FYN i BLK (*B Lymphoid tyrosine Kinase*). La tirosina cinasa SYK és reclutada a les regions fosforilades de CD79A/B, que li serveixen d'ancoratge, on és activada per

la fosforilació de la família de cinases SRC i per autofosforilació. La proteïna transmembrana CD19 és fosforilada per LYN durant la senyalització del BCR, el que permet el reclutament de PI3K i de les proteïnes efectores AKT i BTK a la cara interna de la membrana. SYK és capaç de propagar el senyal d'activació del BCR a través de proteïnes adaptadores com BLNK (*B-cell linker protein*), que coordina la fosforilació i activació de BTK i la fosfolipasa C γ (PLC γ). L'activació del BCR finalment resulta en l'activació de les vies de senyalització de PI3K/AKT/mTOR, NF κ B i MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), les quals promouen la proliferació i supervivència dels limfòcits B, ja siguin normals o malignes (Figura 9).⁴

L'activació del BCR pot ser causada de forma activa depenent d'antigen, la qual activa la resposta del centre germinal, que és el mecanisme predominant en la CLL o el MCL, o bé de forma tònica, probablement independent d'antigen, un procés que sembla estar relacionat amb la supervivència de les cèl·lules B i que participa en la patogènesi de diferents neoplàsies, com ara el limfoma de Burkitt.¹²⁷

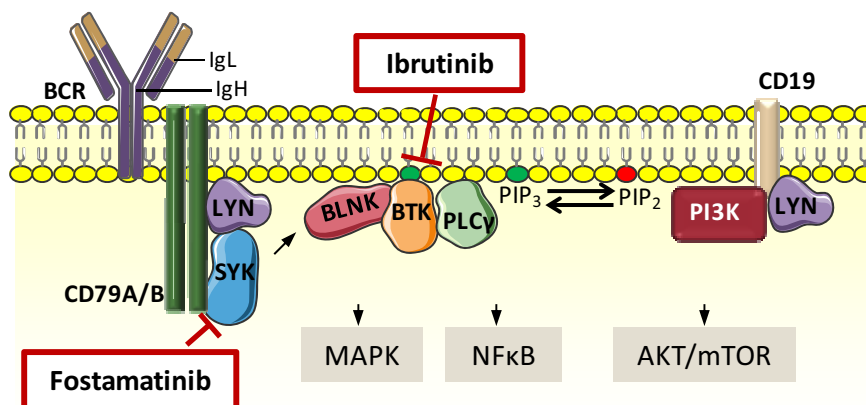


Figura 9 | Senyalització del BCR i inhibidors utilitzats per interferir la via. Amb la unió d'un antigen al BCR, s'estimula una cascada de senyalització i el reclutament de diferents intermediaris que permetran propagar la senyalització a través diferents vies de supervivència com MAPK, NF κ B i AKT/mTOR. Diferents inhibidors dirigits contra aquestes cinases són utilitzats per inhibir la via de senyalització.

Inhibidors de SYK

La fosforilació constitutiva de SYK com a conseqüència de l'activació del BCR s'ha observat tant en la CLL¹²⁸ com en el MCL.¹²⁹

Fostamatinib (R788) és el primer inhibidor de SYK que va entrar en assaigs clínics per al tractament de les neoplàsies limfoides i d'altres alteracions inflamatòries i de caràcter autoimmune. Fostamatinib és un profàrmac del seu component actiu anomenat R406, un INHIBIDOR ATP-COMPETITIU l'efecte citotòxic del qual s'ha descrit prèviament *in vitro*.^{130;131} En la CLL, fostamatinib és capaç d'inhibir els senyals protectors del microambient *in vitro*¹³² i de reduir la proliferació tumoral en el model murí mitjançant la inhibició de la senyalització del BCR dependent d'antigen.¹³³ Resultats similars s'han obtingut en mostres de pacients de CLL tractats amb fostamatinib.¹³⁴ A nivell clínic, en un estudi de fase I/II, fostamatinib va induir activitat clínica significativa en pacients refractaris o amb recaiguda de diferents tipus de neoplàsies limfoides, amb un índex de resposta del 55% en la CLL i un 11% en el MCL.¹¹⁸

Inhibidors de BTK

BTK és una altra cinasa del BCR que mostra activitat constitutiva tant en MCL¹³⁵ com en CLL.¹³⁶

Ibrutinib (PCI-32765) és un potent inhibidor irreversible de BTK que forma una unió covalent amb un residu de cisteïna situat a prop del centre actiu de la cinasa. Només nou altres cinases en el genoma humà tenen un residu de cisteïna situat de forma similar, el que permet una elevada especificitat del fàrmac.¹³⁷

En la CLL, ibrutinib és capaç de disminuir la síntesi de DNA i la viabilitat de cèl·lules primàries en cultiu, malgrat la presència de citocines o cocultiu amb cèl·lules estromals.^{138;139} També va prevenir la progressió de la malaltia en un model animal de CLL.¹³⁹ Ibrutinib ha mostrat disminuir l'expressió en plasma de les quimiocines CLL3 i CLL4,¹³⁹ la secreció de les quals és conseqüència de la senyalització del BCR en el microambient del nòdul limfàtic.¹⁰⁰ La inhibició de BTK amb ibrutinib també sembla bloquejar el procés d'adhesió de les cèl·lules tumorals, on intervenen les integrines, així com també el procés de migració i retenció de les cèl·lules en els teixits limfoides dirigida pels gradients de quimiocines,¹⁴⁰ el que podria explicar per què els pacients tractats amb ibrutinib experimenten un increment transitori de les cèl·lules de CLL en sang perifèrica.¹¹⁹

INHIBIDOR ATP-COMPETITIU
Anàleg d'ATP. Inhibeix l'activitat enzimàtica, com per exemple cinasa, competint amb l'ATP per la unió al centre actiu de l'enzim.

En el MCL, el tractament amb ibrutinib inhibeix l'estimulació de BTK, PLC γ , ERK (*Extracellular Regulated Kinase*) i AKT induïda pel cocultiu amb cèl·lules estromals i l'estimulació del BCR, així com l'adhesió i la quimiotaxis de les cèl·lules tumorals, de forma similar a l'observada en cèl·lules de CLL.¹⁴¹

A nivell clínic, els resultats dels primers assaigs amb ibrutinib van ser encoratjadors, especialment en pacients amb MCL i CLL on es va observar una significant activitat clínica, mínima toxicitat i bona tolerabilitat pels pacients.¹⁴² En assaigs de fase I/II es va observar una resposta del 71% en pacients de CLL refractaris a d'altres tractaments o amb recaiguda, independentment de factors de risc com la deleció de 17p, l'estat mutacional de *IGHV*, el nombre de teràpies prèvies o un estadi avançat de la malaltia.¹¹⁹ Ibrutinib també ha demostrat ser efectiu en pacients de CLL majors de 65 anys, un sector susceptible a patir infeccions amb els règims d'immunoquimioteràpia.¹⁴³ Tot i que la implicació del BCR en la patogènesi del MCL té menys evidències que en la CLL,¹⁵ un assaig clínic de fase II amb ibrutinib en pacients refractaris o en recaiguda de MCL va demostrar que ibrutinib aconseguia un ORR del 68%, 21% de respostes completes i 47% de respostes parcials.⁵¹ En ambdues malalties s'ha observat limfocitosi com a conseqüència del tractament.^{142;144} Ibrutinib ha estat aprovat recentment per la FDA per al tractament de MCL.¹⁴⁵

2.2. Inhibidors de la via de senyalització PI3K/AKT/mTOR

La senyalització per PI3K/AKT/mTOR proporciona una via de transducció de diferents estímuls, incloent receptors de la superfície cel·lulars i canvis metabòlics dins la cèl·lula, cap a les diferents vies efectores que afectaran el creixement cel·lular, el metabolisme, la supervivència, la migració i l'angiogènesi, entre d'altres. Per la seva implicació vital, no és d'estranyar que diferents membres d'aquesta via es trobin freqüentment alterats en càncer,¹⁴⁶ tot promovent la progressió tumoral i la resistència a la quimioteràpia.¹⁴⁷ El desenvolupament d'inhibidors de PI3K/AKT/mTOR ha incrementat molt durant els últims anys, tal i com ho indica l'elevat nombre d'estudis preclínic o d'assaigs clínics que avaluen els nombrosos compostos dirigits contra elements d'aquesta via de senyalització cel·lular (Figura 10).¹⁴⁸

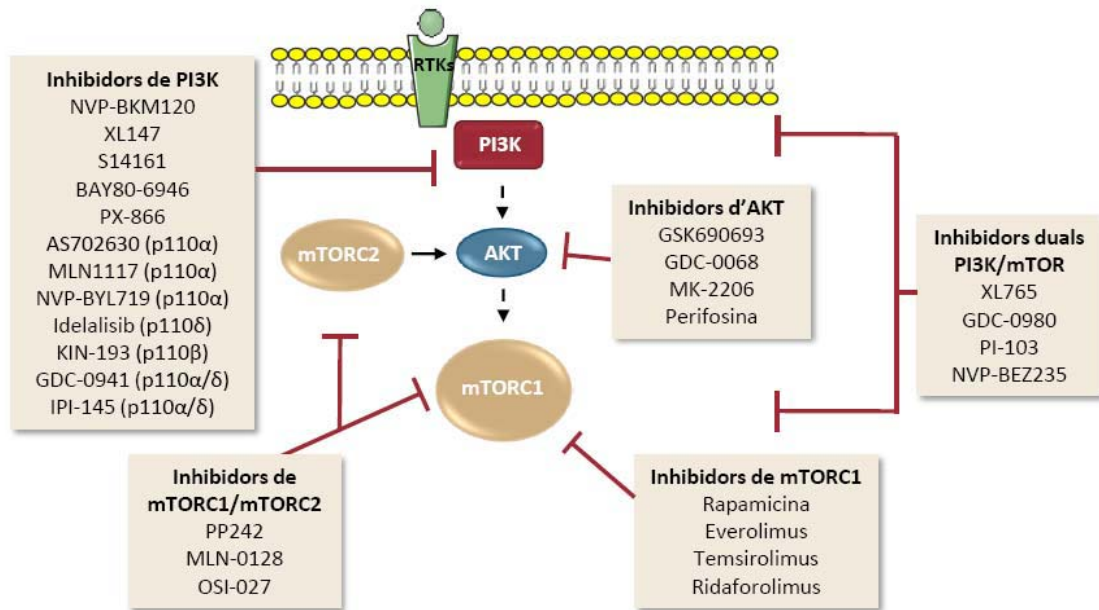


Figura 10 | Selecció d'inhibidors de la via PI3K/AKT/mTOR.

Via de senyalització PI3K/AKT/mTOR

Factors de creixement activen principalment els receptors tirosina cinasa (*Receptor Tyrosine Kinases*; RTKs) que promouen la translocació i activació de PI3K. PI3K és efectora d'altres receptors, i a part del BCR, també ho és dels receptors acoblats a proteïnes G, GTPases (Ras, Rac, Rho entre d'altres), CD40, TNFRs (*Tumour Necrosis Factor Receptors*) i els receptors de BAFF (*B cell Activating Factor*). Quan PI3K és funcional, catalitza la fosforilació de fosfatidilinositol-4,5-bifosfat (PIP₂) a fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfat (PIP₃) a la cara interna de la membrana. Diferents proteïnes amb dominis d'unió als PIP₃ són reclutades a la membrana plasmàtica i participen en la propagació del senyal d'activació del BCR, com ara PDK1 (*Pyruvate Dehydrogenase Kinase, isozyme 1*), AKT o BTK. L'activitat de PI3K està antagonitzada per la fosfatasa PTEN (*Phosphatase and Tensin Homolog*), que catalitza la reacció contrària per formar PIP₂.

Una vegada la proteïna AKT és localitzada a la membrana plasmàtica, fosforilada i activada en resposta a la senyalització del BCR, interacciona amb un gran nombre d'efectors que afectaran el creixement, la proliferació i la supervivència. Entre

GAP
Proteïna que inactiva proteïnes d'unió a GTP, com els membres de la família Ras, mitjançant la hidròlisi de GTP.

ells, cal destacar mTOR. AKT és capaç d'activar mTOR per dos mecanismes. El primer, indirectament, a través de la fosforilació i inactivació del complex TSC2/TSC1 (*Tuberous Sclerosis protein*), amb activitat GAP (*GTPase-activating protein*), que resulta en l'acumulació de la proteïna RHEB en la seva forma activa d'unió a GTP i la subseqüent activació de mTOR. El segon mecanisme, a través de la fosforilació i atenuació de l'efecte inhibitori que exerceix PRAS40 (*Proline-Rich AKT Substrate of 40kDa*) en mTOR. La proteïna cinasa mTOR es troba associada a diferents proteïnes en dos complexos diferents tant a nivell funcional com estructural. El complex mTORC1 està format per mTOR, RAPTOR (*Regulatory-Associated Protein of mTOR*), mLST8 (*mammalian Lethal with SEC13 protein 8*), DEPTOR (*DEP domain containing mTOR-interacting protein*) i PRAS40. Quan aquest complex és fosforilat i activat per AKT, activa S6K –i el seu substrat RPS6 (*ribosomal protein S6*)– i inhibeix 4EBP1 (*4E-Binding Protein 1*) – alliberant el factor EIF4E (*Eukaryotic translation Initiation Factor 4E*)– per desencadenar el creixement de la cèl·lula i la traducció proteica.

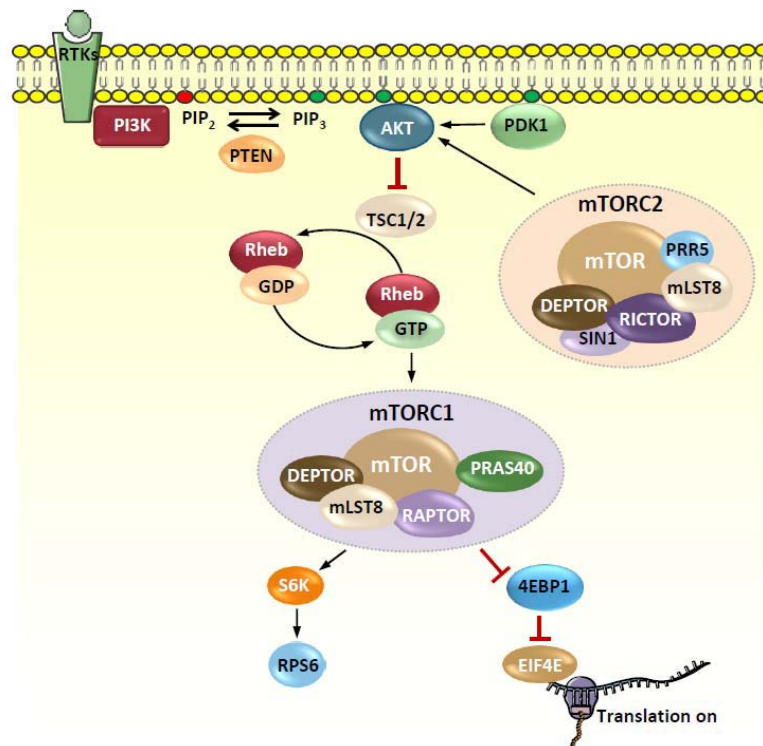


Figura 11 | Via de senyalització PI3K/AKT/mTOR. Amb l'activació de la via, PI3K catalitza la producció de PIP₃ que permet reclutar altres proteïnes efectores que desencadenen una cascada de fosforilacions. AKT, mitjançant la inhibició de TSC1/2, activa mTORC1 i activa el creixement, la proliferació i la síntesi proteica, entre d'altres. PTEN actua com un repressor de la via.

El complex mTORC2 està format per mTOR, RICTOR (*Rapamycin-Insensitive Companion of mTOR*), SIN1 (*mitogen-activated protein kinase associated protein 1*), DEPTOR, PRR5 (*Proline Rich 5*) i mLST8. El seu rol tant en la cèl·lula normal com en oncogènesi no està del tot descrit, tot i que principalment participaria en la organització del citoesquelet, una funció implicada en la motilitat i la capacitat d'invasió de les cèl·lules tumorals. A més a més, mTORC2 activa AKT, i per tant, promou la proliferació cel·lular i la supervivència (Figura 11).¹⁴⁹

PI3K com a diana terapèutica

Existeixen tres classes de PI3K en funció de les seves característiques estructurals i la preferència pel substrats lipídics. Només la classe I de PI3K pot generar PIP₃, els quals es podrien considerar el tipus de fosfoinositols més importants produïts durant la senyalització pel BCR. Els PIP₃ actuen com a missatgers secundaris i s'han vist implicats en càncer.¹⁵⁰ El rol de la classe II de PI3K està mal definit i sembla que no estaria involucrat en processos oncogènics. Finalment, la classe III formada per la subunitat catalítica VPS34 (*Vacuolar Protein Sorting 34*), està implicada en la regulació del trànsit vesicular, incloent la fagocitosis i l'AUTOFÀGIA. Podria estar implicada en la tumorigènesi, tot i que el seu rol és incert.^{151;152}

La classe I de PI3K està formada per una subunitat reguladora (p85) i una subunitat catalítica (p110). Existeixen quatre tipus de subunitats catalítiques diferents que donen lloc a les diferents isoformes de PI3K: p110 α (codificada per *PIK3CA*), p110 β (*PIK3CB*), p110 δ (*PIK3CD*) i p110 γ (*PIK3CG*). D'aquestes isoformes, p110 α i p110 β s'expressen de forma ubiqua, mentre que p110 δ i p110 γ es troben principalment en leucòcits.¹⁵³ Aquestes isoformes tant tenen algunes funcions úniques com comparteixen algunes funcions redundants. Així, ambdues isoformes p110 α i p110 δ participen en el desenvolupament normal de la cèl·lula B,¹⁵⁴ tot i que p110 α sembla que contribueix majoritàriament en la senyalització tònica del BCR,¹⁵⁵ mentre que p110 δ exerceix un rol específic en la senyalització del BCR depenent d'antigen.¹⁵⁶ En cèl·lules neoplàstiques, però, el rol dominant d'una isoforma específica podria perdre's i diferents isoformes assumir funcions redundants.¹⁵²

AUTOFÀGIA
Procés catabòlic cel·lular mitjançant el qual es degraden i es reciclen components cel·lulars via lisosomal.

El paper de les diferents isoformes en la proliferació del MCL ha estat analitzat recentment. S'ha observat un increment de l'expressió de la isoforma p110 α en pacients de MCL en recaiguda, el que suggereix un rol de p110 α en la progressió de la malaltia i limita l'eficàcia dels inhibidors específics de la isoforma p110 δ .¹⁵⁷ D'altra banda, p110 β sembla tenir un rol essencial en la proliferació de tumors que no tenen PTEN funcional, com s'ha descrit en tumors sòlids.¹⁵⁸

Tot i que l'activació constitutiva de la via PI3K/AKT/mTOR pot ser deguda a mutacions de diferents components, l'alteració més freqüent en càncer són les mutacions somàtiques activadores de la subunitat p110 α de PI3K (*PIK3CA*).¹⁵⁹ L'activació constitutiva de PI3K s'ha observat en pacients amb CLL¹⁶⁰ i en MCL, on s'han descrit aproximadament un 15% de casos amb pèrdua de l'expressió de PTEN i un 68% amb amplificació del gen *PIK3CA*.¹⁶¹

Inhibidors de PI3K

Els diferents fàrmacs dirigits contra PI3K es poden dividir bàsicament en dues categories: inhibidors ATP competitiu de totes les isoformes de PI3K o inhibidors selectius d'alguna de les isoformes. En la primera categoria, s'inclouen, entre d'altres, els inhibidors reversibles **NVP-BKM120** (buparlisib), **XL147**,¹⁶² **S14161**¹⁶³ i **BAY-806946**,¹⁶⁴ que està actualment en un assaig clínic de fase II en limfoma no-Hodgkin (NCT01660451). També l'inhibidor pan-PI3K irreversible **PX-866**, que es troba actualment en desenvolupament pel tractament dels tumors sòlids.¹⁶⁵

En la segona categoria, s'inclouen els inhibidors específics d'alguna de les isoformes de PI3K, com ara els inhibidors selectius de p110 α **AS702630**,¹⁶⁶ **MLN1117**¹⁶⁷ i **NVP-BYL719**,¹⁶⁸ l'inhibidor de p110 δ **idelalisib** o l'inhibidor de p110 β **KIN-193**.¹⁶⁹

És interessant l'inhibidor dual PI3K p110 α/δ , **GDC-0941**,¹⁷⁰ capaç de reduir la proliferació de cèl·lules de MCL, amb un efecte antitumoral major que els causats per un inhibidor de p110 α o p110 δ .¹⁷¹ Aquest fet suggereix que els efectes de prosupervivència de l'activació de PI3K en pacients de MCL refractaris estan mediat per l'activació combinada de les isoformes p110 α i p110 δ , i que la inhibició simultània permet tenir efectes antitumorals més pronunciats. També cal destacar l'inhibidor dual

p110 α / δ **IPI-145**, actualment en assaig clínic de fase I en neoplàsies hematològiques en fase avançada, entre les quals la CLL (NCT01476657).¹⁷²

D'entre tots els inhibidors de PI3K desenvolupats, destacaré l'activitat d'idelalisib i NVP-BKM120. Ambdós compostos estan essent avaluats actualment en un gran nombre d'assaigs clínics i ja han mostrat tenir una significativa activitat antitumoral.

- **Idelalisib** (GS-1101, CAL-101) és un inhibidor específic de PI3K δ (IC₅₀ de 2.5nM vs 500-900nM per PI3K β i PI3K α , respectivament).^{173;174} En la CLL, l'efecte citotòxic d'idelalisib és independent de l'estat mutacional de *IGHV* i de la deleció de 17p.¹⁷⁵ En el context d'un microambient protector, amb factors solubles com CD40L i BAFF o cocultiu amb cèl·lules estromals, el tractament amb idelalisib va demostrar que bloquejava la senyalització del BCR i revertia l'efecte dels senyals de prosupervivència.¹⁷⁵ La modulació de la protecció exercida pel microambient va ser confirmada en estudis posteriors en els quals idelalisib era també capaç de interferir amb la migració i l'adhesió de les cèl·lules de CLL, així com disminuir la producció de quimiocines secretades per les cèl·lules de CLL.¹⁷⁶ Resultats similars s'han observat en el MCL.¹⁷⁴ En un assaig clínic de fase I en pacients amb CLL refractaris o en recaiguda, idelalisib va demostrar ser ben tolerat i reduir la limfadenopatia en $\geq 50\%$ en el 81% dels pacients. També es va observar un increment transitori del nombre de limfòcits en sang perifèrica ($>50\%$), consistent amb altres inhibidors del BCR. El percentatge de resposta global aconseguit va ser del 72%, incloent un 33% de casos amb resposta parcial amb limfocitosi persistent induïda pel tractament.¹²⁰ En el MCL, en un estudi de fase I es van obtenir efectes similars i una resposta del 40% en pacients de MCL.¹⁷⁷ Per tant, idelalisib bloquejaria l'adhesió a les cèl·lules estromals¹⁷⁸ i la senyalització de les quimiocines que permeten mantenir els limfòcits en els nòduls limfàtics, un entorn crucial per la senyalització del BCR i la supervivència de les cèl·lules tumorals, promovent l'alliberament de les cèl·lules canceroses del seu microambient protector i contribuint a l'eficàcia del fàrmac.¹⁰⁰
- **NVP-BKM120** (buparlisib) és un inhibidor oral de totes les isoformes de PI3K^{179;180} que ha demostrat ser eficaç tant en models *in vitro* com *in vivo* en tumors sòlids¹⁸¹⁻

¹⁸³ i en neoplàsies hematològiques.¹⁸⁴⁻¹⁸⁶ S'ha descrit que NVP-BKM120 és 3.6 vegades més potent que idelalisib en cèl·lules primàries de CLL *in vitro*,¹⁸⁷ el que confirmaria el rol crucial de les diferents isoformes de PI3K –no només de p110δ– en processos essencials com la supervivència, la migració i la resistència als fàrmacs.¹⁸⁸ NVP-BKM120 va disminuir els nivells de fosforilació de diferents biomarcadors moleculars utilitzats com a indicadors d'inhibició de la via de senyalització de PI3K, com ara AKT, 4EBP1 i S6K. A més a més, el compost també era capaç d'inhibir la protecció del microambient, ja que en cèl·lules primàries de CLL en cocultiu amb cèl·lules estromals, NVP-BKM120 induïa apoptosi.¹⁸⁷ Recentment, en un assaig clínic de fase I en tumors sòlids en fase avançada, NVP-BKM120 ha mostrat ser segur a la màxima dosi tolerada, amb un favorable perfil farmacocinètic i activitat antitumoral preliminar.¹⁸⁹ Actualment, NVP-BKM120 està sent avaluat en un assaig clínic de fase I en pacients amb leucèmia en fase avançada (NCT01396499) i en un assaig clínic de fase II en pacients amb limfoma no-Hodgkin refractaris o en recaiguda (NCT01693614, NCT01719250).

AKT com a diana terapèutica

Amb l'activació de la via de senyalització de PI3K, AKT és translocat cap a la membrana cel·lular on els residus de PIP₃ generats per PI3K li serveixen com ancoratge. L'activació d'AKT requereix tant de la fosforilació per PDK1 (en el residu Thr³⁰⁸) com pel complex mTORC2 (Ser⁴⁷³). AKT és l'efector principal de PI3K. S'han identificat múltiples substrats d'AKT, incloent TSC2, a través del qual activa mTORC1, o els membres de la subfamília FOXO. Els factors de transcripció FOXO, que són inhibits mitjançant la fosforilació d'AKT, participen en la regulació de la proliferació i supervivència de varis tipus cel·lulars. D'entre tots els seus membres, FOXO3A (*Forkhead box O3*) s'ha descrit com un important regulador de l'expressió de BIM.¹⁹⁰ AKT també té substrats que no són pròpiament de la via de senyalització de PI3K, com GSK3 (*Glycogen Synthase Kinase 3*), p27, p21, MDM2 o membres proapoptòtics de la família de BCL2, entre d'altres (Figura 12).¹⁹¹

AKT és una família de cinases formada per tres isoformes: AKT1, AKT2 i AKT3. Mutacions amplificadores de les diferents isoformes s'han descrit en diversos tumors sòlids,¹⁹¹ tot i que la prevalença en neoplàsies limfoides és molt baixa. (COSMIC,

Catalogue of somatic mutations in cancer, 2013)^{192;193} En una significant fracció de casos de CLL s'ha demostrat l'activació constitutiva d'AKT, el que augmenta els senyals de supervivència.¹⁹⁴ En MCL, les mostres primàries de casos molt proliferatius (blastoids) semblen estar associades a la presència d'AKT activat.¹⁹⁵

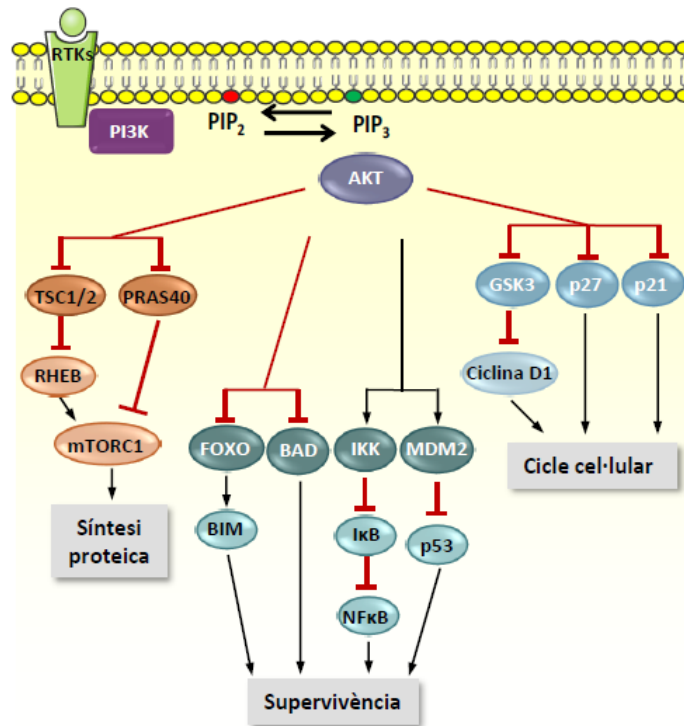


Figura 12 | Principals dianes d'AKT. AKT exerceix un rol de prosupervivència cel·lular a través dels seus múltiples substrats. Promou la síntesi proteica mitjançant l'activació de mTORC1, interfereix amb proteïnes proapoptòtiques, afavoreix l'activació d'altres vies de supervivència com ara NFκB i inhibeix proteïnes inhibidores del cicle cel·lular, afavorint la proliferació.

Inhibidors d'AKT

El desenvolupament d'inhibidors específics d'AKT es preveia una tasca difícil degut a l'elevat grau d'homologia de la butxaca d'unió de l'ATP de les proteïnes AKT, la proteïna cinasa A (PKA) i la proteïna cinasa C (PKC). **GSK690693**^{196;197} i **GDC-0068**,¹⁹⁸ per exemple, són inhibidors ATP-competitius que inhibeixen les tres isoformes d'AKT. La inhibició d'AKT en biòpsies de tumors de pacients tractats amb GDC-0068 va correlacionar amb la inhibició del creixement tumoral en models preclínic.¹⁹⁹

D'altra banda, també estan en desenvolupament els INHIBIDORS AL·LOSTÈRICS d'AKT, com ara **MK-2206**²⁰⁰ en assaig clínic en tumors sòlids en fase avançada,²⁰¹ i la **perifosina**.²⁰²⁻²⁰⁴ Ambdós compostos estan actualment en assaig clínic per diferents neoplàsies

hematològiques. Pel que fa a la CLL, es va observar que MK-2206 era capaç de mobilitzar les cèl·lules de CLL cap a la sang perifèrica i disminuir la secreció mediada pel BCR de les citocines CCL2, CCL3 i CCL4.²⁰⁰ D'altra banda, els resultats d'un assaig clínic

INHIBIDORS AL·LOSTÈRICS

Molècules que s'uneixen a una part que no és el centre actiu d'una altra proteïna de manera que aquesta interacció en disminueix l'activitat enzimàtica.

de fase II amb la perifosina en CLL van ser modestos, aconseguint principalment una estabilització de la malaltia. A més, no es va observar correlació entre la resposta al fàrmac i la fosforilació d'AKT.²⁰⁵

El rol potencial d'aquests inhibidors encara s'està estudiant. Sembla ser que, malgrat algunes neoplàsies amb la mutació *PIK3CA* s'esperaria que responguessin bé a aquests inhibidors, estudis amb línies cel·lulars amb aquesta mutació demostren que només hi ha una mínima activació d'AKT. Això suggereix que l'activació de la via també pot ser a través de processos independents d'AKT, a través de PDK1 i el seu substrat SGK3 (*Serum/Glucocorticoid regulated Kinase family 3*).²⁰⁶

mTOR com a diana terapèutica

Com el mateix nom implica, el descobriment de mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) està íntimament lligat al descobriment de la rapamicina (sirolimus). La rapamicina és un metabòlit secundari produït pel bacteri *Streptomyces hygroscopicus*, aïllat d'una mostra recol·lectada del sòl de la illa de Pasqua (en polinesi *Rapa Nui*).²⁰⁷ La rapamicina posseeix propietats antifúngiques, antitumorals i immunosupressores. Estudis amb llevats van permetre entendre el mecanisme d'acció de la rapamicina i van dur a la identificació de mTOR,²⁰⁸ una proteïna altament conservada des dels llevats fins als humans.

El complex mTORC1 respon a diversos estímuls, entre els quals, els que estan més ben caracteritzats són els factors de creixement i els nutrients. Una vegada activat, mTORC1 promou la biogènesi lipídica, la síntesi proteica i el metabolisme, mentre que inhibeix l'autofàgia. A més a més, a part d'estar íntimament lligat al control de la traducció de mRNA, mTORC1 està emergint com un regulador clau de la transcripció gènica. STAT3, SREBPs (*Sterol-Regulatory-Element-Binding Proteins*), PPAR α / γ (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*), HIF1 α (*Hypoxia Inducible Factor 1, alpha subunit*), PGC1 α (*PPAR γ coactivator-1*) o TFEB (*Transcription Factor EB*) són factors de

transcripció modulats per mTORC1, la majoria dels quals estan principalment implicats en vies metabòliques.²⁰⁹

A diferència de mTORC1, el complex mTORC2 és més desconegut. Tot i que originalment es va descriure que la seva activitat era insensible al tractament agut amb rapamicina, l'exposició crònica amb rapamicina és capaç d'interrompre l'activitat de mTORC2 en alguns tipus cel·lulars.²¹⁰ mTORC2 regula la supervivència cel·lular, el metabolisme i la organització del citoesquelet.²⁰⁹

Tot i que les mutacions de mTOR en neoplàsies hematològiques són molt poc habituals, (COSMIC, *Catalogue of somatic mutations in cancer*, 2013) s'han identificat diferents mutacions de mTOR en tumors sòlids.^{211;212}

Rapamicina i Rapalogs

- **Rapamicina.** La rapamicina suprimeix la proliferació dels limfòcits T estimulada per la IL2, conferint un potent efecte immunosupressor. Per aquest motiu es va aprovar per la prevenció del rebuig en el transplantament de ronyó. La rapamicina també té una altra aplicació clínica per la prevenció de la reestenosi. Com a conseqüència de les seves propietats antiproliferatives, es van desenvolupar els anàlegs semi-sintètics de la rapamicina coneguts amb el nom de rapalogs (temsirolimus, everolimus i ridaforolimus), inhibidors al·lostèrics de mTOR amb millorades propietats farmacocinètiques. Els rapalogs van ser els primers inhibidors de la via PI3K/AKT/mTOR d'entrar a la clínica i fins al moment, els únics aprovats clínicament.²¹³
- **Temsirolimus.** El seu ús és aprovat com a monoteràpia en algunes neoplàsies, com el carcinoma renal²¹⁴ i el MCL.⁵³ Temsirolimus ha mostrat resultats encoratjadors en assaigs clínics de fase II⁵⁴ i III⁵³ en pacients refractaris o en recaiguda de MCL, aconseguint fins a un 41% de resposta global. En un estudi clínic recent, malgrat el reduït tamany mostral, l'eficàcia de temsirolimus administrat com a monoteràpia ha resultat ser major que en estudis previs, amb un 60% de resposta global.²¹⁵
- **Everolimus.** També és aprovat com a monoteràpia en el tractament del carcinoma renal,²¹⁶ en el càncer de mama avançat²¹⁷ i en tumors neuroendocrins d'origen

pancreàtic.²¹⁸ Everolimus també ha mostrat resultats prometedors en diferents assaigs clínics de fase II en limfoma, on s'ha aconseguit una ORR del 20-32% en MCL,^{219;220} amb un 49% de pacients amb malaltia estabilitzada.²²⁰ En canvi, en un assaig clínic de fase II realitzat en una població de pacients de MCL refractaris o intolerants al bortezomib, altament pretractats, l'activitat d'everolimus ha resultat ser inferior, amb una ORR inferior al 10%.²²¹ En la CLL s'han aconseguit resultats modestos (ORR del 18%), però s'ha observat que everolimus també mobilitza les cèl·lules de CLL de les masses nodals cap a la sang perifèrica, aconseguint una reducció de la limfadenopatia en el 36% dels pacients. Aquesta mobilització de cèl·lules tumorals cap a la circulació sanguínia les pot fer més sensibles a la teràpia i per tant, obre la porta a possibles estratègies de combinació de fàrmacs.²²²

- **Ridaforolimus.** La seva eficàcia a nivell clínic està sent avaluada en diferents tipus de càncer,²²³ entre els quals, diferents neoplàsies hematològiques com la CLL i el MCL. De fet, en un assaig clínic de fase II, els pacients de MCL van ser els que van tenir una resposta més favorable, amb un índex de resposta del 33%. També va aconseguir estabilitzar la malaltia en un 75% de casos de CLL.²²⁴

Limitacions dels rapalogs

Malgrat l'aprovació clínica dels rapalogs com a estratègia antitumoral en monoteràpia, la resposta a aquests anàlegs és més aviat modesta i generalment, poc mantinguda. Diferents limitacions semblen ser la causa (Figura 13). Primerament, la inhibició sostinguda de mTORC1 dóna lloc a la pèrdua d'un bucle retroactiu inhibitori que paradoxalment comporta l'activació de la senyalització dels receptors tirosina cinases i, per tant, de PI3K. Aquesta regulació negativa que es perd amb el tractament amb rapalogs està amplificada per diferents components de la via de senyalització de PI3K/AKT/mTOR, com ara el substrat de mTORC1 GRB10 (*growth factor receptor-bound protein 10*),^{225;226} S6K²²⁷⁻²²⁹ i el mateix complex mTORC1, a través de RAPTOR.²³⁰ Segon, els rapalogs inhibeixen mTORC1 de forma incompleta, ja que el seu substrat 4EBP1 és refosforilat i és refractari a un tractament prolongat amb la rapamicina o els seus derivats, fins i tot quan l'altre substrat de mTORC1, S6K, es manté permanentment inhibit.²³¹ Aquesta incapacitat de mantenir la defosforilació de 4EBP1

pot donar lloc a la persistència de la síntesi proteica a un nivell suficient per permetre la proliferació, mantenir la senyalització de mTORC1 activa i evadir la inhibició farmacològica. Finalment, els rapalogs són més efectius en inhibir mTORC1 que mTORC2, de manera que l'eix PI3K/mTORC2/AKT podria mantenir-se actiu en els tumors.²¹³

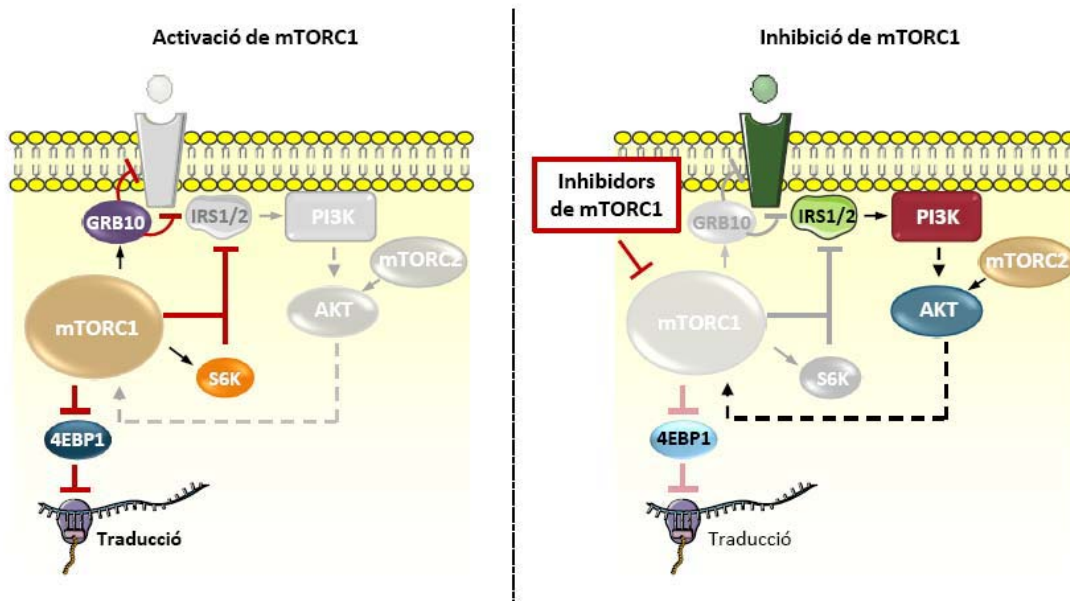


Figura 13 | Bucles compensatoris en la via de mTOR. Quan la via es troba activada es promou la traducció proteica entre d'altres funcions, mentre que mTORC1 i els substrats S6K i GRB10 inhibeixen la senyalització del receptor tirosina cinasa per regular l'activació de la via. En canvi, amb l'ús dels inhibidors de mTORC1, com els rapalogs, es perd aquesta inhibició retroactiva i per tant, s'activen les proteïnes que es troben per sobre de mTOR en la cascada de senyalització, com IRS1/2 (*Insulin Receptor Substrate 1/2*), PI3K i AKT. A més, els rapalogs són inefficients en inhibir mTORC2 i 4EBP1 de forma completa, mantenint certs nivells de síntesi proteica.

Inhibidors de mTOR ATP-competitius

A diferència de la rapamicina i els seus derivats, que són inhibidors al·lostèrics, la nova generació d'inhibidors de mTOR són anàlegs d'ATP i bloquegen l'activitat cinasa dels dos complexos de mTOR, mTORC1 i mTORC2. En comparació amb els rapalogs, els nous inhibidors haurien de ser efectius en bloquejar la reactivació d'AKT i mostrar una major eficàcia.²¹³ A nivell preclínic, l'inhibidor **PP242** va mostrar una marcada resposta terapèutica en tumors resistents a la rapamicina, ja que va aconseguir una inhibició efectiva del complex insensible a la rapamicina mTORC2,²³² a part d'una inhibició més

sostinguda de mTORC1, amb una major inhibició de l'eix 4EBP1-eIF4E que controla la traducció.²³³ **MLN-0128** (INK128), un derivat de PP242, ha mostrat activitat preclínica en leucèmia aguda^{232;234} i es troba actualment en diferents assaigs clínics de fase I en tumors sòlids en fase avançada i mieloma múltiple, entre d'altres. **OSI-027** ha mostrat bloquejar eficientment la proliferació i induir l'apoptosi a través de la proteïna proapoptòtica PUMA en línies cel·lulars i mostres primàries de diferents tipus de neoplàsies limfoides, entre les quals el MCL i la CLL.²³⁵ Actualment es troba en un assaig clínic de fase I per a tumors sòlids i limfomes (NCT00698243).

Inhibidors duals PI3K/mTOR

L'activitat dual es basa en les similituds estructurals dels dominis catalítics de mTOR i de la subunitat p110 de PI3K, proporcionant l'avantatge potencial d'inhibir la via de senyalització a dos nivells (inhibició dels dos complexos de mTOR, mTORC1 i mTORC2, i PI3K). Entre els múltiples inhibidors duals desenvolupats, **XL765** i **GDC-0980** estan en assaigs clínics en tumors sòlids en fase avançada.²³⁶ GDC-0980 a més, també es troba en assaig clínic en limfoma no-Hodgkin. **PI-103** és un altre inhibidor dual que ha demostrat reduir la proliferació i la supervivència de les cèl·lules en diferents neoplàsies hematològiques,^{237;238} entre les quals, la CLL.¹⁸⁸

NVP-BEZ235 (dactolisib)¹⁷⁹ es troba actualment en un elevat nombre d'assaigs clínics, principalment en tumors sòlids en fase avançada, com el càncer de mama metastàtic o el carcinoma renal. També ha mostrat activitat preclínica en diferents neoplàsies limfoides^{186;239-242} i és actualment en un assaig clínic de fase I de leucèmia aguda (NCT01756118).²⁴³

NVP-BEZ235 exerceix un efecte citotòxic en línies cel·lulars de MCL mitjançant la disminució de MCL1²⁴⁴ i s'han observat sinergismes amb agents convencionals, com ara el bortezomib, la vincristina o la doxorubicina.²⁴⁵ S'ha descrit la capacitat de NVP-BEZ235 de superar els senyals del microambient *in vitro* en línies cel·lulars de MCL,²⁴⁶ i la inhibició de la secreció de múltiples factors de creixement i citocines com ara la IL6, IL10 i VEGFA (*Vascular Endothelial Growth Factor A*) en limfomes especialment depenents de la via de senyalització de PI3K/AKT/mTOR, com és el cas del limfoma d'efusió primari.²³⁹

2.3. Inhibidors de la via de NFκB

NFκB és una família de factors de transcripció (p50 i el seu precursor p105, p52 i el seu precursor p100, p65/RELA, RELB i c-REL) que participa en la transcripció de gens involucrats en processos com la proliferació, la inflamació o la supressió de l'apoptosi. L'activació d'aquesta via depèn de la fosforilació de les proteïnes inhibidores IκB (*Inhibitor of κB*) portada a terme pel complex IKK (*IκB kinase*).²⁴⁷ Aquest complex és activat per la senyalització del BCR i és una via requerida per la supervivència en molts tipus de limfoma. AKT, d'entre els múltiples substrats, també activa el complex IKK, convertint-se en un regulador positiu de NFκB.¹⁹¹ Al seu torn, IKK activa mTOR a través de TSC1.²⁴⁸

La via de NFκB està constitutivament activada en el MCL²⁴⁹ i en la CLL.²⁵⁰ A més, la inhibició d'IKK mitjançant l'inhibidor **BMS-345541** ha mostrat activitat antitumoral *in vitro* en ambdues neoplàsies limfoides.^{251;252} Malgrat s'han utilitzat diferents inhibidors de IKK, cap d'ells ha rebut l'aprovació clínica, probablement per problemes de toxicitat.²⁵³ Actualment, entre els nous inhibidors de la via de NFκB destaquen el possible paper dels inhibidors de NIK, proteïna que fosforila i activa IKK, especialment en els casos de MCL refractaris al tractament amb inhibidors del BCR on s'ha descrit una possible dependència de NIK.²⁵⁴ D'altra banda, el nou inhibidor d'IKK **13-197**, ha mostrat interferir amb les vies de senyalització NFκB i mTOR en cèl·lules de MCL.²⁵⁵

2.4. Inhibidors de la via de MAPK

En els limfòcits B, la via de les MAPK és principalment activada pel BCR que desencadena una cascada de senyalització jeràrquica incloent Ras/Raf/MEK/ERK, que transmeten el senyal des dels receptors de membrana al nucli per controlar l'expressió gènica, com ara MYC,²⁵⁶ regular l'apoptosi (membres de la família de BCL2),²⁵⁷ la proliferació,²⁵⁸ la motilitat cel·lular (com FAK, *Focal Adhesion Kinase*)^{259;260} i la traducció proteica. Entre els seus múltiples substrats, ERK1/2 regula la traducció a través de MNK1/2, que fosforila eIF4E, i RSK1 (*Ribosomal protein S6 Kinase, 90kDa, polypeptide 1*), que regula el substrat de mTOR S6K, entre d'altres. Per tant, S6K és

regulada tant per PI3K/AKT/mTOR com per la via de les MAPK.²⁶¹ A més a més, RSK1 i ERK1/2 fosforilen TSC2, afavorint l'activació de mTORC1.²⁶² Finalment, Ras també pot activar la via de PI3K/AKT/mTOR.

L'activació constitutiva d'ERK s'ha descrit en la CLL,²⁶³ mentre que nivells elevats de RAF s'han observat en pacients de MCL.²⁶⁴ D'entre els diferents inhibidors d'aquesta via, en destaquen l'inhibidor de RAF **vemurafenib**²⁶⁵ i l'inhibidor de MEK1/2 **selumetinib**²⁶⁶ actualment en assaig clínic en diferents neoplàsies hematològiques.

L'administració combinada d'aquests inhibidors amb inhibidors de la via PI3K/AKT/mTOR s'ha proposat com a estratègia terapèutica per a sobrepassar les diferents connexions entre ambdues vies de senyalització. En tumors sòlids, s'ha descrit que la inhibició de mTORC1 amb everolimus resulta en l'activació de ERK1/2 a través de la via S6K/PI3K/RAS/RAF/MEK.²⁶⁷ En una cohort de pacients amb tumors sòlids en fase avançada, la presència de mutacions *KRAS*, que activa la via MAPK, estava associada amb una manca de benefici de la teràpia amb everolimus.²⁶⁸ Tot plegat, això ressalta la importància de tenir en compte les possibles alteracions i/o mutacions en la via de les MAPK per tal d'optimitzar el tractament amb inhibidors de mTOR.

3. Inhibidors de proteïnes reguladores de la mort cel·lular com a estratègia terapèutica en les neoplàsies limfoides de cèl·lula B

L'evasió de la mort cel·lular és una característica distintiva gairebé sistemàtica de les cèl·lules neoplàstiques.²⁶⁹ Aquest tret afavoreix la progressió tumoral i la resistència a la teràpia. Entre els diferents tipus de mort cel·lular, el paper de l'apoptosi en el càncer ha estat àmpliament estudiat,²⁷³ mentre que el rol dual de l'autofàgia, amb propietats tant promotores com supressores tumorals, i la seva implicació en l'execució de la mort cel·lular, segueix sent controvertit.^{270;271}

3.1. La família BCL2 com a diana terapèutica

La família de proteïnes BCL2

La família de proteïnes BCL2 juga un paper primordial en la regulació de la permeabilització de la membrana mitocondrial externa i en l'apoptosi. Els membres de d'aquesta família estan subdividits en tres grups en funció de la seva estructura i funció. BAX i BAK són els elements crítics que desencadenen la fase efectora de l'apoptosi. Mitjançant un canvi conformacional, formen porus a la membrana mitocondrial, n'augmenten la permeabilitat –pèrdua del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)– i permeten l'alliberament al citosol de factors apoptogènics, com el citocrom C, que finalment activaran les CASPASES. En condicions favorables a la supervivència cel·lular, BAX i BAK estan controlats pels membres antiapoptòtics de la família BCL2 (BCL2, BCLXL, BCLW, MCL1, BCL-B i Bfl-1/A1). Condicions d'estrès, en canvi, mobilitzen els membres del tercer grup de la família, les proteïnes BH3-*only*.

CASPASES

Enzims proteolítics que condueixen el procés de destrucció cel·lular. Hi ha caspases iniciadores (caspases 2, 8, 9 i 10) i d'altres d'efectores (caspases 3, 6 i 7) responsables de proteolitzar centenars de proteïnes.

Aquestes proteïnes (BIM, BMF, NOXA, PUMA, BAD, HRK i BIK) són essencials per a activar els mediadors BAX i BAK, ja sigui per unió directe o bé indirectament, per unió als membres antiapoptòtics de la família BCL2, i

alliberant BAX i BAK que desencadenaran el procés apoptòtic (Figura 14).²⁷⁰ S'han detectat nivells elevats de BCL2 tant en CLL^{272;273} com en MCL, on són freqüents els guanys del número de còpies de BCL2.²² L'elevada expressió de la proteïna MCL1, la traducció de la qual pot ser augmentada per la via de senyalització PI3K/AKT/mTOR,²⁷⁴ és comú en els tumors més agressius, com el MCL.²⁷⁵ En la CLL, s'ha descrit que MCL1 proporciona informació sobre la progressió de la malaltia.^{276;277} També s'ha documentat pèrdua de BIM per deleció homozigòtica en un percentatge considerable de casos de MCL.^{278;279} BIM actua com un supressor de tumors en neoplàsies de cèl·lula B i l'elevada expressió de MCL1, conjuntament amb una ràtio BIM/MCL1 baixa, és un predictor de poca resposta als agents quimioterapèutics.²⁷⁶

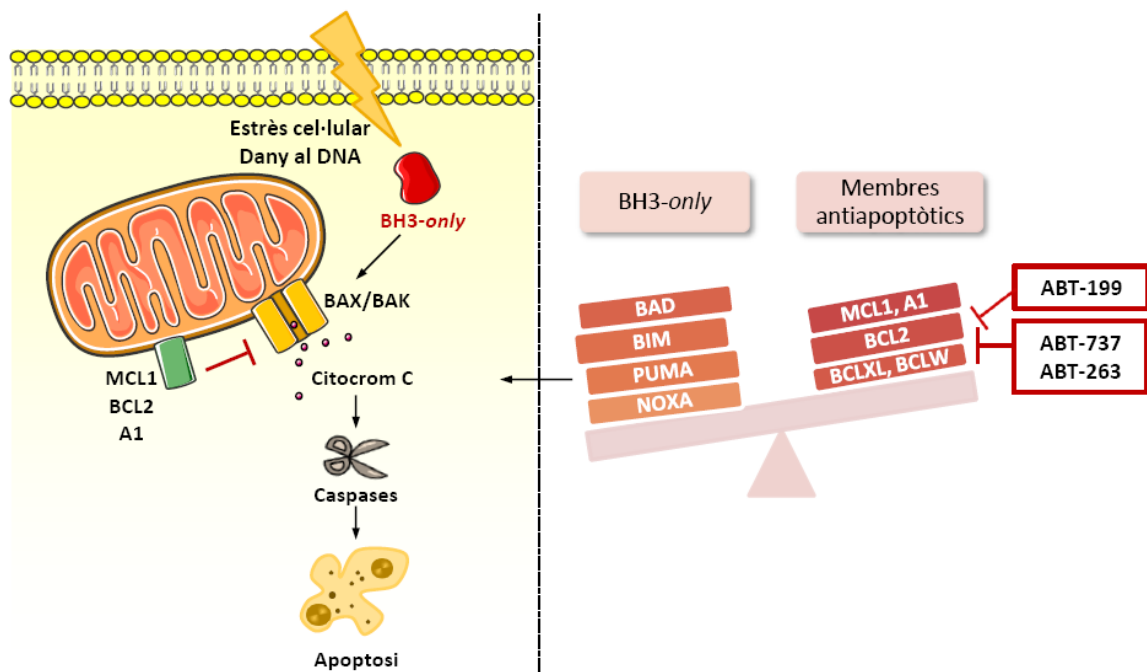


Figura 14 | Les BH3-only i els BH3-mimètics. Un estímul citotòxic indueix l'activació transcripcional de les BH3-only que faciliten el canvi conformacional de BAX i BAK i la formació d'un porus a la membrana mitocondrial externa. L'alliberació de factors apoptogènics com el citocrom C acaba activant les caspases responsables de la proteòlisi. L'apoptosi es desencadena quan el balanç entre proteïnes proapoptòtiques i antiapoptòtiques és favorable. En cèl·lules canceroses, la teràpia amb BH3-mimètics afavoreix l'activació de les BH3-only i el procés apoptòtic.

Inhibidors dels membres antiapoptòtics de la família BCL2

S'han desenvolupat compostos que imiten l'acció de les proteïnes BH3-*only* i per tant, promouen l'apoptosi. Els compostos BH3-mimètics difereixen en la seva especificitat i afinitat pels diferents membres de la família BCL2 (Figura 14). ABT-737 i el seu anàleg oral navitoclax (ABT-263) s'uneixen amb elevada afinitat a BCL2, BCLXL i BCLW, però amb molt poca afinitat a MCL1 i a Bfl-1/A1,²⁸⁰ l'elevada expressió dels quals pot causar resistència a la teràpia.²⁸¹ En assaigs clínics de fase I/II, navitoclax va demostrar una bona activitat antitumoral, particularment en la CLL, aconseguint una resposta (ORR) del 35%.^{282;283} Malauradament, s'ha observat que navitoclax causa trombocitopènia com a conseqüència de la inhibició de BCLXL en plaquetes.²⁸⁴

El compost ABT-199 és un inhibidor selectiu de BCL2, amb una marcada reducció de l'efecte tòxic de les plaquetes.^{285;286} *In vitro*, s'ha observat que causa apoptosi a través de BAX, tot i que aquest efecte citotòxic no és selectiu de les cèl·lules tumorals ja que també afecta als limfòcits B normals.²⁸⁷ En un assaig clínic de fase I en pacients amb desordres limfoproliferatius es va obtenir una bona resposta, inclosos els casos de MCL.²⁸⁸ Actualment, es troba en diferents assaigs de fase I/II en CLL i en limfoma no-Hodgkin (NCT01969695, NCT01889186, NCT01328626). En la CLL s'han aconseguit notables resultats, amb un 13% (7 casos) de respostes completes i un 72% (39 casos) de respostes parcials.²⁸⁹

3.2. L'autofàgia com a diana terapèutica

L'autofàgia és el procés de degradació intracel·lular essencial pel manteniment de la homeostàsia i la supervivència cel·lular. És considerat principalment un procés citoprotector i un mecanisme de control cel·lular que permet eliminar agregats proteics i orgànuls malmesos. Alteracions de l'autofàgia es poden produir en diferents tipus de malalties, com desordres neurodegeneratius, malalties infeccioses, desordres metabòlics o en el càncer.²⁹⁰

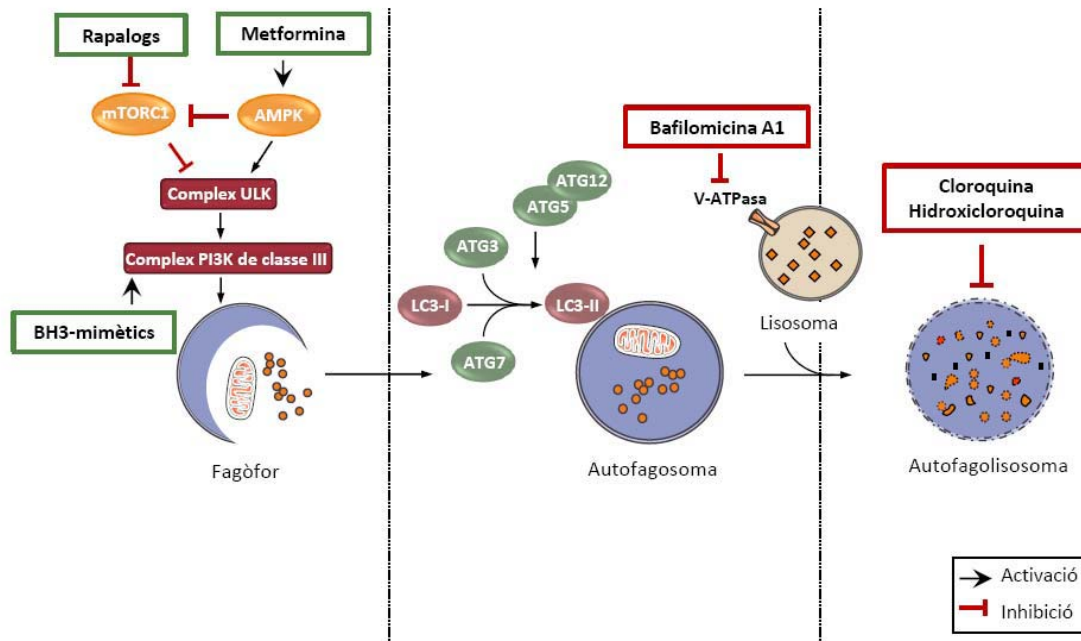


Figura 15 | El procés autofàgic i fàrmacs moduladors de l'autofàgia. mTORC1 regula negativament l'autofàgia mitjançant la inhibició del complex ULK. En canvi, l'activació d'AMPK induïx l'autofàgia. El complex ULK i el complex PI3K de classe III són responsables de la inducció i la fase inicial de la formació del fagòfor. La proteïna antiapoptòtica BCL2 regula negativament el complex PI3K de classe III. L'expansió del fagòfor requereix de múltiples proteïnes com ATG3, ATG5, ATG7 i LC3 que faciliten la formació de l'autofagosoma. La seva fusió amb un lisosoma dona lloc a l'autofagolisosoma, de manera que el contingut de la vesícula serà llistat i degradat. Inhibidors de mTORC1 (rapalogs), activadors d'AMPK (metformina), inhibidors de membres antiapoptòtics de la família BCL2 (BH3-mimètics) són inductors de l'autofàgia, mentre que els inhibidors de la fusió i funció lisosomal (bafilomicina A1, cloroquina i hidroxicloroquina) interfereixen en el procés autofàgic.

La maquinària de l'autofàgia

La macroautofàgia (habitualment referida com a autofàgia) succeeix quan vesícules de doble membrana anomenades autofagosomes, engloben en el seu interior material citoplasmàtic. Els autofagosomes es fusionen amb els lisosomes, els quals alliberen proteases lisosomals, convertint l'autofagosoma en un autofagolisosoma amb capacitat degradativa. Els aminoàcids i les macromolècules resultants són finalment reciclades per cobrir necessitats metabòliques, com podria ser la síntesi de noves proteïnes, o bé, per la formació de membranes i mantenir així les funcions lisosomals (Figura 15).²⁹¹ L'autofàgia és un procés no selectiu, tot i que hi ha d'altres tipus d'autofàgia que preferencialment recol·lecten un substrat específic.²⁹²⁻²⁹⁵

Per la formació dels autofagosomes es requereix la mobilització d'una quantitat substancial de membrana, principalment provinent del reticle endoplasmàtic,^{296;297} i la participació d'un elevat nombre de proteïnes ATG (*autophagy-related*) i PI3K de classe III (Taula 3).²⁹⁸

Taula 3 | Selecció de proteïnes implicades en l'autofàgia

Proteïna	Posició en la via autofàgica	Funció
ULK1 i ULK2	Complex ULK	Cinases que participen en la senyalització de mTOR i permeten el reclutament d'altres proteïnes per a la formació de l'autofagosoma
Beclin 1	Complex PI3K de classe III	Involucrada en l'activació de l'autofàgia
VPS34	Complex PI3K de classe III	Subunitat catalítica del complex PI3K de classe III
ATG3	Conjugació de LC3-PE	Conjuga LC3 a PE
ATG5	Conjugació d'ATG5-ATG12	Participa en l'activació d'ATG3
ATG7	Conjugació de LC3-PE i ATG12	Activa ATG12 i LC3
LC3	Conjugació de LC3-PE	Involucrada en el reclutament del contingut dels autofagosomes i en la fusió de la membrana
ATG9	Proteïna integral de membrana	Involucrada en la formació de l'autofagosoma
ATG12	Conjugació d'ATG5-ATG12	Participa en l'activació d'ATG3

Abreviacions: ULK, *UNC51-Like autophagy activating Kinase*; PI3K, *Phosphatidylinositol 3-Kinase*; VPS34, *Vacuolar Protein Sorting 34*; ATG, *Autophagy-related Gene*; PE, *Phosphatidylethanolamine*.

Els autofagosomes es produeixen com a conseqüència de la privació de nutrients, energia o factors de creixement, bàsicament a través de dos mecanismes. El primer, mitjançant la inhibició de mTORC1, de manera que augmenta l'estabilitat del complex ULK (*UNC51-Like autophagy activating Kinase*).²⁹⁹ El segon, a través de la fosforilació i activació de ULK1 per AMPK (*Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase*), un sensor intracel·lular de la ràtio AMP/ATP.³⁰⁰ El complex ULK promou la formació dels autofagosomes mitjançant la regulació del complex de proteïnes PI3K de classe III (també anomenat complex Beclin 1). Aquest complex és també fonamental per iniciar el procés de formació d'autofagosomes (o fagòfors) i està compost, entre d'altres proteïnes, per VPS34 i Beclin 1. ULK1 fosforila Beclin 1 i activa VPS34, que produirà fosfoinositols-3-fosfats necessaris per a reclutar altres proteïnes efectores en el procés autofàgic (Figura 15).³⁰¹

En el procés de formació dels autofagosomes també destaca la proteïna LC3 que, gràcies a la conversió de la seva forma soluble LC3-I a LC3-II, s'associa a la membrana de l'autofagosoma de forma estable. Per aquest motiu, LC3 s'utilitza habitualment com a marcador per monitoritzar el procés d'autofàgia.³⁰²

Autofàgia i càncer

El càncer és la primera malaltia que va estar lligada a la deficiència de l'autofàgia³⁰³ i a la vegada, paradoxalment, la primera malaltia en la qual s'han utilitzat inhibidors de l'autofàgia en assaigs clínics.³⁰⁴ Aquesta paradoxa pot comprendre's pels efectes diferencials de l'autofàgia en els diferents estadis de la tumorigènesi. Tot i la controvèrsia, la visió més prevalent és que l'autofàgia actua com un mecanisme supressor de tumors que evita la iniciació del tumor i una via de prosupervivència que, en els estadis més avançats, ajuda a les cèl·lules tumorals a superar l'efecte dels agents quimioterapèutics.²⁷¹

Autofàgia com un mecanisme supressor de tumors

Molts gens supressors de tumors promouen l'autofàgia, com ara PTEN, TSC1, TSC2 que ho fan a través dels seus efectes inhibitoris en la via de mTOR, i molts oncogens són responsables de la inhibició de l'autofàgia. Els oncogens PI3K i AKT, per exemple, inhibeixen l'autofàgia a través de l'activació de mTORC1. A més, AKT també inhibeix l'autofàgia directament fosforilant Beclin 1, retenint-la al citoesquelet i evitant la seva interacció amb VPS34.³⁰⁵ L'oncogèn BCL2 regula negativament l'autofàgia mitjançant la seva unió a Beclin 1, evitant que formi part del complex de PI3K de classe III.^{306,307}

S'han proposat diferents mecanismes per tal d'explicar com l'autofàgia contribueix a la supressió tumoral:

- **Estabilitat genòmica.** L'autofàgia elimina orgànuls malmesos, especialment mitocòndries, que generen espècies reactives d'oxigen (ROS; *Reactive Oxygen Species*) i promouen estrès genotòxic, així com senyalització inflammatòria i tumorigènica.^{308;309} A més a més, s'ha observat que la reducció dels nivells de Beclin 1 contribueixen a la degradació del gen supressor de tumors p53.³⁰⁵
- **Inducció de la mort cel·lular.** Una modalitat diferent a l'apoptosi, anomenada mort cel·lular per autofàgia, permetria eliminar cèl·lules malignes en moments d'estrès oncogènic. En aquest procés, la supressió específica de l'autofàgia evita la mort cel·lular i el procés final que condueix a la mort cel·lular és mitjançant l'increment del flux autofàgic.^{310;311} N'és un exemple l'estímul oncogènic RAS, que

es va observar que induïa l'expressió de NOXA i Beclin 1 causant mort cel·lular per autofàgia. La supressió d'ATG5, ATG7 o Beclin 1, en canvi, prevenia la mort cel·lular i reestablia la capacitat d'expansió de les cèl·lules transformades.³¹² Tot i que s'han descrit connexions entre l'aparell autofàgic i les cascades de senyalització apoptòtiques,^{313;314} aquest és un tema molt controvertit i, en la majoria dels casos, sembla que l'apoptosi i l'autofàgia són dos processos mútuament inhibitoris. L'autofàgia i l'apoptosi sovint succeeixen en la mateixa cèl·lula en una seqüència en la qual l'autofàgia precedeix l'apoptosi. Un estrès estimula una resposta autofàgica, i quan aquest estrès excedeix una durada crítica o un nivell determinat d'intensitat, s'activa aleshores l'apoptosi (Figura 16).³¹⁵

- **Activació del sistema immunològic.** Finalment, l'autofàgia podria afavorir la rejecció del tumor pel sistema immunològic. El rol de l'autofàgia en la presentació antigènica i la funció immune està ben establert,³¹⁶ i sembla que podria incrementar la resposta a la quimioteràpia.³¹⁷

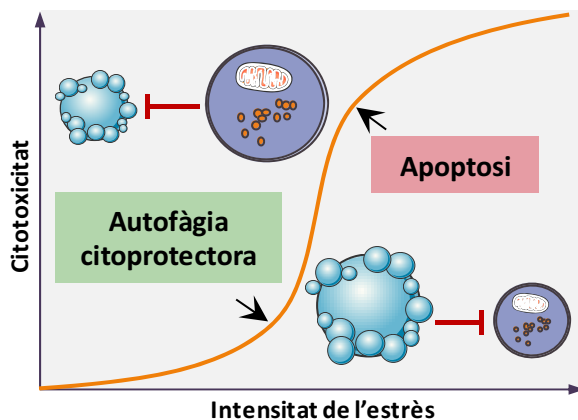


Figura 16 | Relació funcional entre l'autofàgia i l'apoptosi. L'autofàgia constitueix una barrera inicial contra l'apoptosi quan el nivell d'intensitat de l'estrès és baix. A mesura que la intensitat creix, s'indueix l'apoptosi i s'inactiva l'autofàgia.

L'autofàgia com un mecanisme de progressió tumoral

El fet que l'autofàgia afavoreixi la supervivència cel·lular durant una situació d'estrès metabòlic,³¹⁸ planteja la qüestió de si també actuaria com un mecanisme de quimioresistència, cobrint les necessitats metabòliques del tumor. La primera evidència que afirmava aquest concepte va ser en un model murí de limfoma induït per MYC, en el qual el tractament amb un inhibidor de l'autofàgia augmentava

l'activitat de p53 i la regressió tumoral induïda pels agents citotòxics.³¹⁹ Diversos estudis han corroborat aquesta hipòtesi.^{271;320}

Una altra de les aplicacions dels inhibidors de l'autofàgia està lligada a la capacitat d'incrementar l'exposició d'antígens diana a la superfície de les cèl·lules tumorals. Per exemple, s'ha descrit que prevenir la degradació lisosòmica de CD74 mitjançant la inhibició de l'autofàgia, millora l'eficàcia antitumoral de l'anticòs monoclonal anti-CD74 milatuzumab en MCL.³²¹ Resta per veure si aquesta aproximació podria incrementar l'eficàcia d'altres anticòsos monoclonals com rituximab en altres limfomes no-Hodgkin i en la CLL.

Fàrmacs moduladors de l'autofàgia

Certs agents que s'utilitzen com a teràpia anticancerosa indueixen l'autofàgia (Figura 15). Un exemple és tamoxifèn, administrat de forma preventiva en persones amb risc de desenvolupar càncer de mama familiar.³²² Els inhibidors de mTORC1 també s'ha observat que activen l'autofàgia en diferents neoplàsies hematològiques^{323;324} o els BH3-mimètics com ABT-737.^{325;326} La metformina, un fàrmac antidiabètic que activa AMPK i indueix l'autofàgia,³²⁷ s'ha observat que disminueix el risc de càncer en pacients diabètics.³²⁸

D'altra banda, l'ús dels inhibidors de l'autofàgia s'ha focalitzat principalment en línies cel·lulars tumorals amb elevats nivells d'autofàgia basal o en conjunció amb agents que directament estimulen les vies de senyalització de l'autofàgia, com els inhibidors de mTOR o els inhibidors duals PI3K/mTOR. La cloroquina i la hidroxiclороquina són els compostos més àmpliament utilitzats per inhibir l'autofàgia i actualment estan sent avaluats clínicament en molts tipus de càncer, entre els quals, les neoplàsies hematològiques.^{320;329} Ambdós compostos són fàrmacs antimalàrics i actuen principalment inhibint l'acidificació lisosomal, el que bloqueja la digestió del contingut de la vesícula i resulta en l'acumulació al citoplasma d'autofagolisosomes que no poden ser degradats. La bafilomicina A1, un inhibidor específic de la bomba de protons lisosomal (V-ATPasa), que neutralitza el pH lisosomal i bloqueja la fusió dels lisosomes amb els autofagosomes, també s'utilitza per interferir en el procés autofàgic (Figura 15).³⁰²



Objectius

Objectius generals

La via de supervivència PI3K/AKT/mTOR es troba constitutivament activada en molts tumors, fet que ha afavorit el desenvolupament de nombrosos inhibidors al considerar-se una possible opció terapèutica.^{148;192} Tant el MCL com la CLL són dues neoplàsies limfoides per les quals encara no hi ha cap teràpia completament efectiva i en les que la via de PI3K/AKT/mTOR està constitutivament activada.

En la CLL s'han descrit resultats esperançadors amb l'inhibidor específic de la isoforma p110δ de PI3K, idelalisib.¹²⁰ Ara bé, s'han descrit possibles redundàncies entre les diferents isoformes de PI3K i el rol de la isoforma p110α en la progressió tumoral, fets que han suggerit la importància d'inhibir totes les isoformes de PI3K.^{157;330} En aquest context, el *primer objectiu* d'aquesta tesi es centra en estudiar l'efecte antitumoral de NVP-BKM120, un inhibidor de PI3K, en la CLL.

D'altra banda, s'ha aprovat la utilització de temsirolimus, un inhibidor de mTORC1, en el tractament del MCL.⁵³ La estratègia d'inhibir la via de PI3K/AKT/mTOR a un nivell inferior de la cascada de senyalització ha demostrat una bona tolerabilitat i certa activitat antitumoral com a monoteràpia, especialment en el MCL.^{215;220;330;331} L'efectivitat d'aquests agents, però, ha quedat reduïda en part per la presència de bucles retroactius que paradoxalment, promouen la supervivència de les cèl·lules tumorals.^{228;229} Per aquest motiu, aquests compostos són bons candidats en combinació amb altres fàrmacs que permetin superar aquests mecanismes de resistència. El *segon objectiu* d'aquesta tesi es basa en analitzar els mecanismes relacionats amb la sensibilitat i la resistència a everolimus, un inhibidor de mTORC1, en el MCL.

Amb el desenvolupament d'inhibidors de segona generació, com els inhibidors catalítics duals PI3K/mTOR, es pretén suprimir la reactivació compensatòria de la via i solucionar els possibles mecanismes de resistència.²¹³ Per aquest motiu, el *tercer objectiu* d'aquesta tesi pretén determinar la millor estratègia terapèutica en el MCL mitjançant l'estudi comparatiu dels inhibidors everolimus (inhibidor de mTORC1), NVP-BKM120 (inhibidor de PI3K) i NVP-BEZ235 (inhibidor dual PI3K/mTOR).

Objectius concrets

1. Estudiar l'efecte antitumoral de NVP-BKM120, un inhibidor de PI3K, en la CLL.
 - Determinar l'efecte citotòxic de NVP-BKM120 en mostres primàries de CLL.
 - Caracteritzar els mecanismes moleculars pels quals NVP-BKM120 és capaç d'induir l'apoptosi.
 - Estudiar l'activitat de NVP-BKM120 en presència de senyals de supervivència del microambient.
 - Potenciar l'efecte citotòxic d'aquest compost combinant-lo de forma racional amb altres fàrmacs.
2. Analitzar els mecanismes relacionats amb la sensibilitat i la resistència a everolimus, un inhibidor de mTORC1, en el MCL.
 - Determinar l'efecte antitumoral d'everolimus en línies cel·lulars i cèl·lules primàries de MCL.
 - Descriure els mecanismes moleculars implicats en l'efecte antitumoral d'everolimus en el MCL.
 - Validar noves combinacions terapèutiques que millorin l'activitat d'everolimus, especialment en els casos resistents.
3. Determinar la millor estratègia terapèutica en el MCL mitjançant l'estudi comparatiu dels inhibidors everolimus (inhibidor de mTORC1), NVP-BKM120 (inhibidor de PI3K) i NVP-BEZ235 (inhibidor dual PI3K/mTOR).
 - Determinar la sensibilitat a cada un d'aquests compostos en mostres primàries de MCL.
 - Analitzar el perfil d'expressió gènica de mostres primàries de MCL tractades amb everolimus, NVP-BKM120 o NVP-BEZ235.
 - Validar funcionalment la implicació de noves vies de senyalització en la resposta a aquests compostos.



Resultats

Primer Article

L'inhibidor de fosfatidilinositol-3-cinasa NVP-BKM120 supera la resistència a senyals derivats del microambient mitjançant la regulació de l'axis AKT/FOXO3A/BIM en cèl·lules de leucèmia limfàtica crònica

Laia Rosich, Ifigènia Saborit-Villarroya, Mónica López-Guerra, Sílvia Xargay-Torrent, Arnau Montraveta, Marta Aymerich, Neus Villamor, Elias Campo, Patricia Pérez-Galán, Gaël Roué i Dolors Colomer

Unitat d'Hematopatologia, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Barcelona, Espanya

Haematologica. 2013 Nov;98(11):1739-47

Resum

Objectiu: La via de fosfatidilinositol-3-cinasa està constitutivament activada en la leucèmia limfàtica crònica principalment com a conseqüència de senyals microambientals, incloent la interacció amb cèl·lules estromals i CXCR4, i l'activació del receptor dels limfòcits B. Degut a la importància de la senyalització de PI3K en la CLL, el nostre propòsit ha estat investigar l'activitat de NVP-BKM120, un inhibidor oral de totes les isoformes de PI3K de classe I.

Disseny experimental: La sensibilitat a NVP-BKM120 es va analitzar en 37 mostres primàries de CLL i 4 donants sans. L'apoptosi es va quantificar i caracteritzar mitjançant tècniques de citometria de flux, com ara el doble marcatge d'anexina V i iodur de propidi per determinar l'exposició dels residus de fosfatidilserina. Es va avaluar la resposta a NVP-BKM120 en el context de l'estimulació del BCR (amb anticossos anti-IgM) i del contacte directe amb cèl·lules estromals derivades del moll de l'os humà (línia cel·lular HS-5) per simular el microambient tumoral *in vitro*. La senyalització de NVP-BKM120 es va caracteritzar mitjançant PCR quantitativa, *Western blot* i silenciament gènic amb siRNA. En l'anàlisi de la migració es va incloure l'assaig de

polimerització d'actina, en el qual s'avalua el grau de polimerització dels filaments d'actina mitjançant el marcatge amb fal·loïdina, i el comptatge de cèl·lules migrades envers la quimiocina CXCL12 per citometria de flux.

Resultats: NVP-BKM120 va induir apoptosi en la majoria de mostres primàries de CLL independentment dels marcadors pronòstics habituals. El compost va bloquejar la senyalització de PI3K, va disminuir la fosforilació d'AKT i FOXO3A donant lloc a la disminució traduccional de MCL1 i a la inducció transcripcional de BIM. D'acord amb aquests resultats, el silenciament selectiu de *BIM* va revertir l'apoptosi induïda per NVP-BKM120 i, a més, l'inhibidor de PI3K va augmentar l'apoptosi causada per l'agent BH3-mimètic ABT-263. Addicionalment, NVP-BKM120 va ser capaç d'inhibir l'activació d'AKT deguda tant a l'estimulació del BCR com a l'efecte protector del cocultiu estromal, i sensibilitzar les cèl·lules de CLL a la bendamustina i la fludarabina. NVP-BKM120 també va disminuir la secreció de quimiocines de les cèl·lules de CLL en resposta a l'estimulació del BCR, així com la quimiotaxis i la polimerització de l'actina induïda per CXCL12.

Conclusions: Aquests resultats demostren que NVP-BKM120 efectivament inhibeix la senyalització de PI3K i interfereix en l'efecte protector del microambient tumoral, amb la subseqüent inducció de l'apoptosi a través de l'axis AKT/FOXO3A/BIM. L'ús de NVP-BKM120, per tant, podria representar una bona estratègia terapèutica com a monoteràpia o en combinació per al tractament de la CLL.

The phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor NVP-BKM120 overcomes resistance signals derived from microenvironment by regulating the Akt/FoxO3a/Bim axis in chronic lymphocytic leukemia cells

Laia Rosich, Ifigènia Saborit-Villarroya, Mónica López-Guerra, Sílvia Xargay-Torrent, Arnau Montraveta, Marta Aymerich, Neus Villamor, Elias Campo, Patricia Pérez-Galán, Gaël Roué, and Dolores Colomer

Hematopathology Unit, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

ABSTRACT

Phosphatidylinositol-3-kinase pathway is constitutively activated in chronic lymphocytic leukemia mainly due to microenvironment signals, including stromal cell interaction and CXCR4 and B-cell receptor activation. Because of the importance of phosphatidylinositol-3-kinase signaling in chronic lymphocytic leukemia, we investigated the activity of the NVP-BKM120, an orally available pan class I phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor. Sensitivity to NVP-BKM120 was analyzed in chronic lymphocytic leukemia primary samples in the context of B-cell receptor and microenvironment stimulation. NVP-BKM120 promoted mitochondrial apoptosis in most primary cells independently of common prognostic markers. NVP-BKM120 activity induced the blockage of phosphatidylinositol-3-kinase signaling, decreased Akt and FoxO3a phosphorylation leading to concomitant Mcl-1 downregulation and Bim induction. Accordingly, selective knockdown of *BIM* rescued cells from NVP-BKM120-induced apoptosis, while the kinase inhibitor synergistically enhanced the apoptosis induced by the BH3-mimetic ABT-263. We also found NVP-BKM120 to inhibit B-cell receptor- and stroma-dependent Akt pathway activation, thus sensitizing chronic lymphocytic leukemia cells to bendamustine and fludarabine. Furthermore, NVP-BKM120 down-regulated secretion of chemokines after B-cell receptor stimulation and inhibited cell chemotaxis and actin polymerization upon CXCR4 triggering by CXCL12. Our findings establish that NVP-BKM120 effectively inhibits the phosphatidylinositol-3-kinase signaling pathway and disturbs the protective effect of the tumor microenvironment with the subsequent apoptosis induction through the Akt/FoxO3a/Bim axis. We provide here a strong rationale for undertaking clinical trials of NVP-BKM120 in chronic lymphocytic leukemia patients alone or in combination therapies.

Introduction

Chronic lymphocytic leukemia (CLL), the most common form of adult leukemia in Western countries, is a heterogeneous disease with variable clinical presentation and evolution. The status of somatic hypermutations in the variable region of immunoglobulin genes (*IGHV*), high expression of ZAP-70 or CD38, and the presence of certain cytogenetic abnormalities have all been associated with poor prognosis. CLL is characterized by the progressive accumulation of mature, monoclonal CD5⁺ B lymphocytes in the peripheral blood and tissue compartments (bone marrow and lymph nodes). These specialized compartments constitute the tumor microenvironment, where malignant cells encounter supporting cells and receive signals to proliferate, progress and acquire drug resistance.¹ *In vivo*, signaling pathways activated by tumor microenvironment interactions include the B-cell receptor (BCR) and NF- κ B pathways. In the last years, new approaches for molecular targeting of the microenvironment have been developed, including CXCR4 antagonists² and specific inhibitors of kinases essential for BCR signal transduction, such as LYN, SYK, BTK, and phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K). All of them disrupt regulatory loops between CLL cells and the microenvironment and have shown encouraging results both at pre-clinical and clinical tri-

als.³ PI3K pathway is at the central core of the signaling network engaged by microenvironment crosstalk and constitutes a key component of cell survival, growth and homing. Of note, PI3K axis is among the most commonly activated signaling pathways in human cancers. Particularly in CLL, PI3K pathway has been found to be constitutive activated in freshly isolated CLL cells.⁴

The PI3K family of lipid kinases consists of 3 classes of which, to date, only class I has been implicated in regulation of hematopoietic cells. Class I includes 4 catalytic isoforms divided into class IA (p110 α , p110 β , p110 δ) and class IB (p110 γ). The PI3K isoforms α and β are ubiquitously expressed, whereas PI3K δ is primarily expressed in leukocytes. In transformed cells, however, the dominant role of a specific isoform may be lost and different isoforms can assume redundant functions.⁵ PI3K phosphorylates phosphatidylinositol lipids, catalyzing the production of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PIP₃) in the cell membrane. This lipid product is the docking site for cytoplasmic kinases that include PDK1 and Akt, which triggers a co-ordinated set of events leading to cell survival.⁶ Thus, as a result of PI3K activity, Akt is activated, this protein being a major downstream effector of PI3K.⁷ Multiple Akt substrates have been identified, including members of the FoxO subfamily of Forkhead

transcription factors and the serine/threonine kinase mammalian target of rapamycin (mTOR).⁸ In CLL, the selective p110 δ PI3K inhibitor GS-1101 (CAL-101) has shown efficacy both in pre-clinical⁹ and clinical studies.¹⁰ However, there is some evidence to suggest possible redundancies between the different PI3K isoforms, appointing for additional therapeutic implications in B-cell malignancies.¹¹ In this way, NVP-BKM120, a 2,6-dimorpholino pyrimidine derivative, is a potent, orally available, pan-class I PI3K inhibitor.^{12,13} It has shown efficacy both in *in vitro* and *in vivo* models.¹⁴⁻¹⁸ In addition, in a recently completed phase I trial in advanced solid tumors, NVP-BKM120 has been shown to be safe at its maximum-tolerated dose showing a favorable pharmacokinetic profile and preliminary antitumor activity.¹⁹ Moreover, NVP-BKM120 is currently being tested in a phase I trial in patients with advanced leukemias (NCT01396499).

In this context, because of the importance of the PI3K pathway in transducing a variety of external, microenvironment-derived migratory, growth, and survival signals, here we investigated the activity of the pan-class I PI3K inhibitor NVP-BKM120 under microenvironment cross-talk conditions.

Methods

Isolation and culture of primary cells

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained from 37 CLL patients who had not received treatment for the previous three months and 4 healthy donors. Written informed consent was obtained from all patients in accordance with the Ethics Committee of the Hospital Clínic, University of Barcelona and the Declaration of Helsinki. This study has been approved by the local Institutional Review Board (2009/4206). The characteristics of the patients are listed in the *Online Supplementary Table S1*. Primary CLL cells were isolated and cultured as described in the *Online Supplementary Methods*.

The percentage of tumoral cells (CD19⁺, CD5⁺) as well as the expression levels of ZAP-70 and CD38 was analyzed by flow cytometry. The *IGHV* gene mutational status was verified according to the European Research Initiative on CLL guidelines.²⁰ Cytogenetic alterations were assessed by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). In cases with 17p deletions, the mutational analysis of the second allele was carried out by direct sequencing, according to the International Agency for Research on Cancer TP53 consortium (<http://p53.iarc.fr>). *SF3B1*, *NOTCH1* and *MYD88* mutations have been previously reported.^{21,22}

Drugs and assessment of apoptotic features by flow cytometry

CLL cells were incubated as indicated with different concentrations of NVP-BKM120 (kindly provided by Novartis). For drug combination studies, cells were simultaneously treated with ABT-263 (Selleck Chemicals), bendamustine (Mundipharma) or fludarabine (Teva) for 48 h. Cell viability was quantified by flow cytometry analysis by double labeling of phosphatidylserine (PS) exposure with Annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC), and cell permeabilization with propidium iodide (PI; Bender Medsystems). Cytotoxicity against PBMCs was evaluated by staining with anti-CD3-FITC (Becton Dickinson), anti-CD19-phycoerythrin (Becton Dickinson) antibodies and Annexin V-Pacific Blue (Life technologies). Labeled cells were analyzed on a FACScan (Becton Dickinson) or Attune (Life Technologies) cytometers. Mitochondrial hallmarks of apoptosis were evaluated as previous-

ly described.²³ Combination index (CI) values were calculated with the CalcuSyn software version 2.0 (Biosoft) by using the Chou and Talalay algorithm. The interaction between 2 drugs was considered synergistic when CI was less than 0.8.

Protein isolation and Western blot analysis

Whole protein extraction and Western blot analysis were carried out as described previously.²⁴ Membranes were probed with the antibodies specified in the *Online Supplementary Methods*.

BCR stimulation by anti-immunoglobulin M antibodies crosslinking

To determine the efficacy of the inhibitor to antagonize BCR-derived pro-survival signals, BCR triggering was performed by adding anti-human immunoglobulin M (anti-IgM; 25 μ g/mL) for 30 min, as described in the *Online Supplementary Methods*. When indicated, cells were treated with NVP-BKM120 simultaneously to the addition of anti-IgM.

Migration and actin polymerization assays

Chronic lymphocytic leukemia cells were treated with NVP-BKM120 for 1 h before CXCL12-induced migration and actin polymerization assay with phalloidin-tetramethyl rhodamine isothiocyanate staining were determined. Detailed methods for these assays are provided in *Online Supplementary Methods*.

Statistical analysis

Data are represented as mean \pm standard error of the mean (SEM) of the indicated experiments. Non-parametric Mann-Whitney test or paired t-tests were used to assess differences between 2 groups. Two-way ANOVA was used to determine how response was affected by two factors. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Detailed methods for PIP₃ ELISA assay, RT-PCR, RNA interference assay and stromal cell co-culture are provided in the *Online Supplementary Methods*.

Results

NVP-BKM120 induces apoptosis in CLL cells independent of prognostic markers

To explore the antitumoral effect of the PI3K inhibitor NVP-BKM120, cells from 6 CLL cases were exposed to increasing concentrations of the drug for 48 h. NVP-BKM120 induced a dose-dependent cytotoxic effect, ranging from 27.12% \pm 18.09 (at 1 μ M) to 60.70% \pm 13.30 at the higher dose tested (10 μ M). At 2 μ M the cytotoxic effect was 31.63% \pm 15.34 (Figure 1A) and was confirmed in 37 CLL cases where the compound induced a mean cytotoxicity of 31.41% \pm 15.69 (Figure 1B). It is important to note that no cytotoxic effect was observed in PBMCs isolated from healthy donors (**, $P < 0.01$) (Figure 1B). A phase I clinical study reported that the maximum tolerated dose of the drug was around 5 μ M¹⁹ and in view of this we performed most of the studies at doses of 1 and 2 μ M in order to avoid off-target effects and toxicities. In addition, NVP-BKM120 also induced cytotoxicity in bone marrow-derived (n=3, 45.9% \pm 14.30) and lymph node-derived (n=3, 39.35% \pm 5.74) CLL cells at the dose of 2 μ M (*data not shown*).

As shown in the *Online Supplementary Table S1*, there were no significant differences in NVP-BKM120 cytotoxicity in cells from patients with *IGHV*-mutated versus *IGHV*-unmutated status or expression of ZAP-70 and CD38. Moreover, we did not find any association

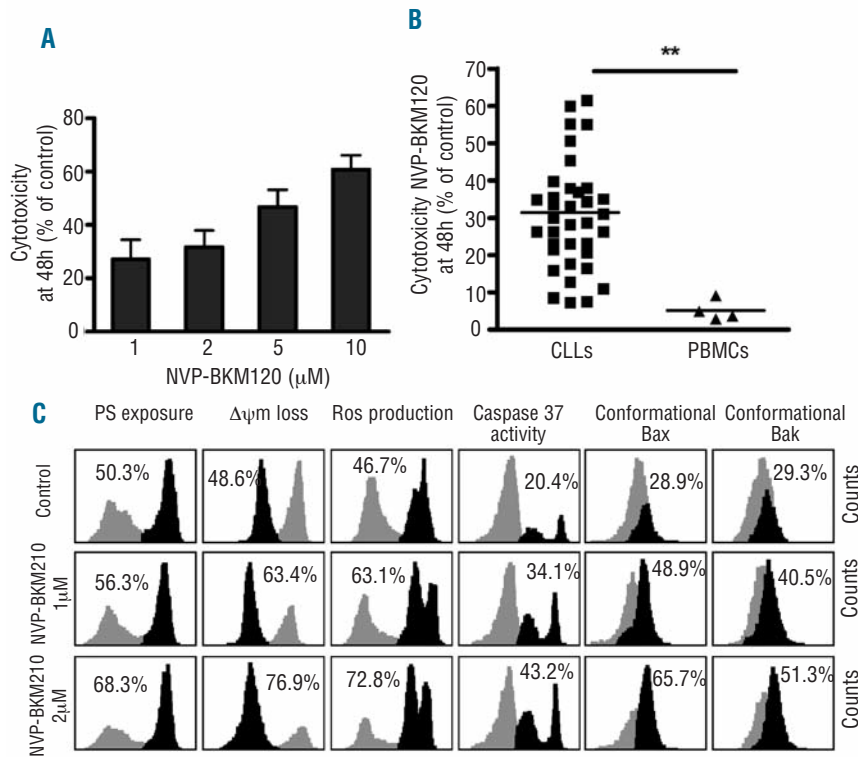


Figure 1. NVP-BKM120 cytotoxicity in primary CLL cells. (A) CLL cells (n=6) were treated with increasing doses of NVP-BKM120 (range 1-10 μM) for 48 h and cytotoxicity was measured by Annexin V. Mean ± SEM of all the samples analyzed. (B) Primary CLL cells (n=37) and PBMCs from healthy donors (n=4) were incubated with 2 μM NVP-BKM120 for 48 h before cytotoxicity was assessed by Annexin V labeling. **, $P < 0.01$. (C) CLL cells were treated with NVP-BKM120 (1 and 2 μM) for 48 h and apoptosis hallmarks were determined by flow cytometry. A representative case was shown (CLL n. 5). Percentages inside each chart refer to the population in black.

between NVP-BKM120 sensitivity and the most frequent cytogenetic (17p, 11q and 13q deletions and trisomy 12) and genomic (*SF3B1*, *NOTCH1* and *MYD88* mutations) alterations encountered in CLL cells, despite the low number of cases in each group (Online Supplementary Table S1).

Importantly, NVP-BKM120 activated the typical mitochondrial hallmarks of apoptosis, including PS exposure, mitochondrial depolarization ($\Delta\psi_m$), reactive oxygen species (ROS) production, caspase-3/7 activity and Bax/Bak conformational changes (Figure 1C).

These results indicated that NVP-BKM120 selectively induced mitochondrial apoptosis in the majority of CLL cases, including those bearing adverse cytogenetic and/or genomic alterations.

NVP-BKM120 blocks PI3K/Akt/FoxO3a signaling pathway while inducing Bim and down-regulating Mcl-1

As NVP-BKM120 is considered a pan-PI3K inhibitor, we then sought to determine its potential on inhibiting PI3K activity. As shown in Figure 2A, by measuring the amount of PIP_3 extracted from control and treated CLL cells, we confirmed that NVP-BKM120 significantly decreased PI3K activity in CLL cells after 30 min ($81.69\% \pm 19.41$ of inhibition, *, $P < 0.05$).

To further evaluate the effect of this compound in the PI3K-mediated signaling, we analyzed the phosphorylation status of its main downstream effector Akt. We found that short time exposure (6 h) to NVP-BKM120 (1 and 2 μM) induced a decrease in the phosphorylation levels of Akt at Ser473 in CLL cells (Figure 2B). As FoxOs proteins are important targets of the PI3K/Akt pathway and the phosphorylation by Akt is one of the major regulatory mechanisms by which FoxO-mediated transcription is repressed,²⁵ we next addressed if FoxO3a was a target for NVP-BKM120-mediated apoptosis in CLL cells. Indeed,

we found a downregulation of FoxO3a phosphorylation that led to the induction of the proapoptotic BH3-only protein Bim in NVP-BKM120-treated CLL cells, according to the role of FoxO3 as a transcription factor of Bim (Figure 2B). We then analyzed the antiapoptotic members of the Bcl-2 family (Bcl-2, Bcl-X_L and Mcl-1) and we found a downregulation of Mcl-1 after exposure to NVP-BKM120 (Figure 2B).

In order to determine whether NVP-BKM120 modulation of Bim and Mcl-1 was transcriptional, we monitored *BIM* and *MCL-1* mRNA levels by qRT-PCR. Exposure to 2 μM NVP-BKM120 for 6 h resulted in no significant changes in *MCL-1* transcripts whereas a significant increase in *BIM* mRNA levels was observed (**, $P < 0.01$) (Figure 3A). As NVP-BKM120 was not interfering with *MCL-1* transcription, we then determined whether its downregulation was due to inhibition of the translation, as it has been described that mTOR regulates translation of mRNAs containing long 5'-UTRs, including Mcl-1.²⁶ Accordingly, it has recently been reported that the multikinase inhibitor sorafenib is able to block Mcl-1 at translational level.^{27,28} As shown in Figure 3B, treatment of primary CLL cells with 2 μM NVP-BKM120 decreased the phosphorylation levels of several kinases implicated in the translational machinery such as mTOR, S6 ribosomal protein, the eIF4E-binding protein 1 (4E-BP1) and the translation initiator factor eIF4E, thus arguing in favor of a translational-dependent regulation of Mcl-1 levels.

Bim contributes to NVP-BKM120-induced mitochondrial apoptosis in CLL cells

To ascertain if the increase in the BH3-only protein Bim was functionally important for NVP-BKM120-induced apoptosis in CLL cells, we used a siRNA-mediated approach to knock-down BIM. Figure 3C shows that

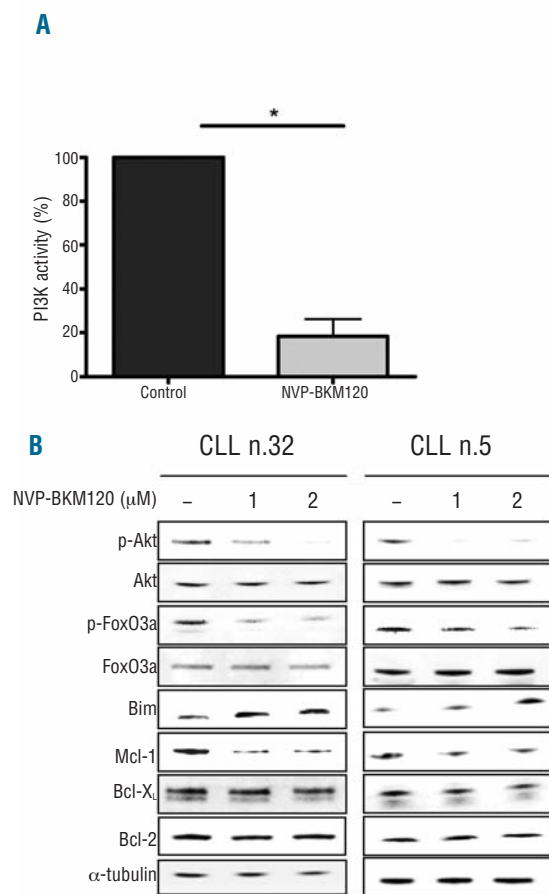


Figure 2. Modulation of PI3K/Akt/FoxO3a pathway and Bcl-2 anti-apoptotic family in CLL cells exposed to NVP-BKM120. (A) Primary CLL cells (n=3) were treated with 2 μ M NVP-BKM120 for 30 min and PI3K activity was assessed. Data represent the mean \pm SEM of the 3 cases analyzed. *, $P<0.05$. (B) CLL cells were incubated with NVP-BKM120 (1 and 2 μ M) for 6 h before Western blot analysis was performed. Two representative cases out of 9 were showed.

transfection with siRNA oligonucleotides directed toward this gene significantly reduced mRNA levels (*, $P<0.05$) providing significant protection against NVP-BKM120-induced cell death when compared to scramble siRNA (***, $P<0.001$).

To provide further evidence of the role of Bcl-2 family of proteins in NVP-BKM120 antitumoral activity in CLL cells, we examined the effect of combining NVP-BKM120 with the BH3-mimetic ABT-263. Simultaneous exposure of CLL cells to NVP-BKM120 (1 μ M) and ABT-263 (2.5 and 5 nM) for 48 h led to a notable reduction in cell viability that was more effective than single drug treatment (Figure 3D). Interestingly, combination of NVP-BKM120 1 μ M and ABT-263 2.5 and 5 nM was found to induce significant cytotoxic effect (***, $P<0.001$), with CI values of 0.528 and 0.607, respectively.

Taken together, these findings support the contribution of Bim to the mitochondrial apoptosis induced by NVP-BKM120.

NVP-BKM120 abrogates BCR-derived signaling

To determine the effects of NVP-BKM120 on CLL cell signaling mediated via the BCR, we stimulated cells with

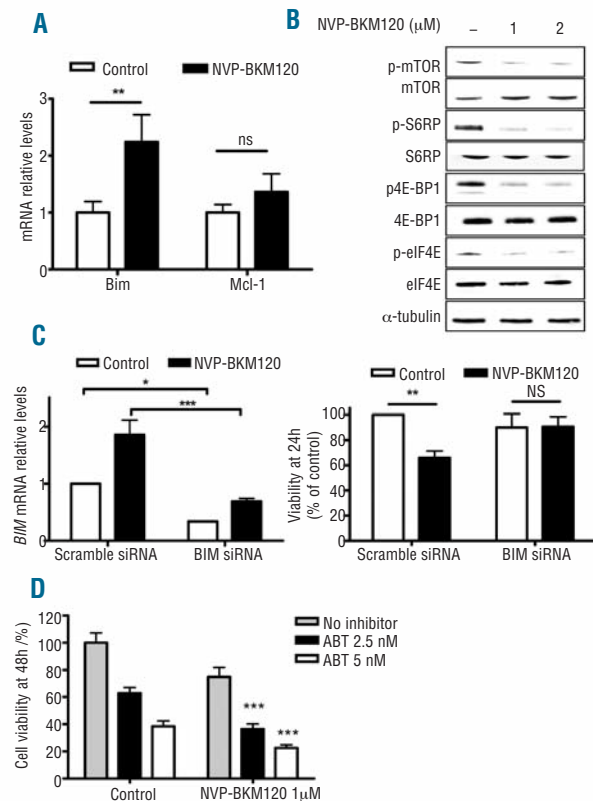


Figure 3. Role of Bim and Mcl-1 in NVP-BKM120-induced apoptosis in CLL cells. (A) Analysis of mRNA expression by quantitative RT-PCR in primary CLL cells (n=8) incubated with 2 μ M NVP-BKM120 for 6 h. Mean \pm SEM of the cases analyzed. **, $P<0.01$; ns=not significant. (B) Western blot analysis of several kinases implicated in the translational machinery in CLL primary cells exposed to NVP-BKM120 (1 and 2 μ M) for 6 hours. A representative case was showed (CLL n. 32). (C) Primary CLL cells were transfected by electroporation with Bim siRNA and non-silencing siRNA in 3 independent experiments. Transfected cells were then incubated with 2 μ M NVP-BKM120 for 24 h. Viability was assessed by flow cytometry labeling of AnnexinV and knockdown of Bim protein was quantified by RT-PCR. Mean \pm SEM of the cases analyzed. *, $P<0.05$, **, $P<0.01$, ***, $P<0.001$; ns=not significant. (D) Primary CLL cells (n=5) were simultaneously exposed to NVP-BKM120 (1 μ M) and ABT-263 (2.5 and 5 nM) for 48 h. Bars represent the mean \pm SEM of cell viability referred to untreated control cells. ***, $P<0.001$.

anti-IgM in the presence of NVP-BKM120. As shown in Figure 4A, NVP-BKM120 2 μ M induced apoptosis with similar efficiency in IgM-stimulated than in non-stimulated CLL cells (**, $P<0.01$, ***, $P<0.001$). In response to BCR engagement, CLL cells increased the expression of phospho-Akt, phospho-FoxO3a and Mcl-1. NVP-BKM120 was able to completely block both basal and IgM-induced phospho-Akt, phospho-FoxO3a and Mcl-1 expression (Figure 4B). Additionally, NVP-BKM120 was also able to induce Bim, at both transcriptional (*, $P<0.05$) and translational levels, even in the presence of anti-IgM (Figure 4C).

We next evaluated whether NVP-BKM120 could block T-cell chemokines CCL3 and CCL4 that are secreted by CLL cells in response to BCR stimulation. Figure 4D shows that BCR stimulation increased CCL3 and CCL4 mRNA levels (CCL3: 12.09 \pm 5.28; CCL4: 10.00 \pm 5.05), whereas NVP-BKM120 incubation significantly blocked this induction (CCL3: 5.43 \pm 3.32, ** $P<0.01$; CCL4:

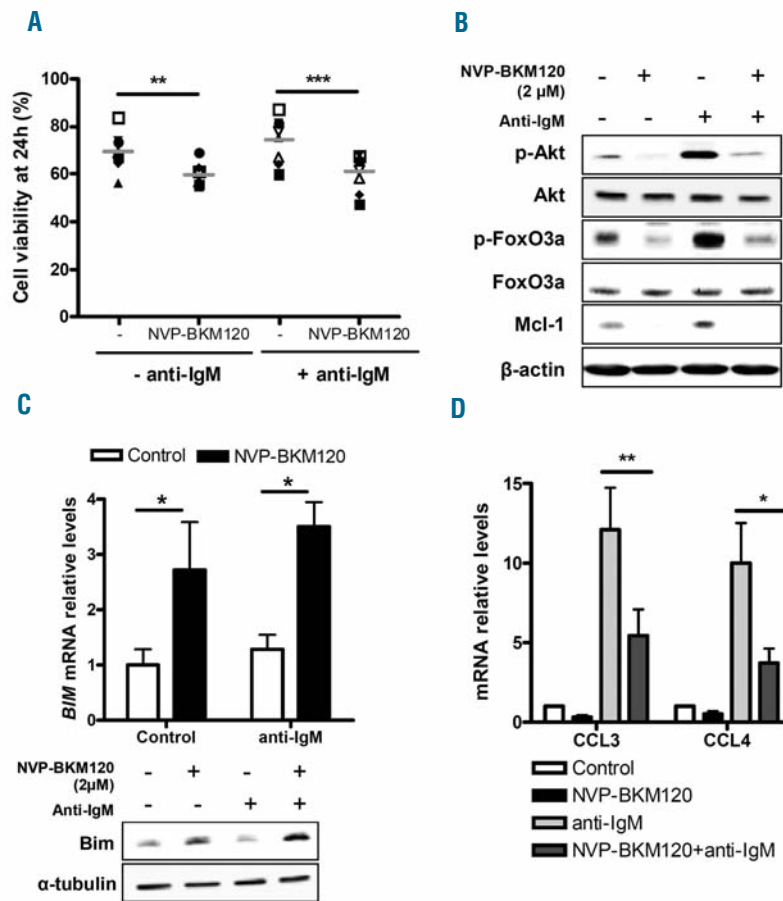


Figure 4. NVP-BKM120 abrogates BCR-derived signals. (A) Primary CLL cells (n=8) were incubated simultaneously with 2 μM NVP-BKM120 and anti-IgM and cell viability was assessed at 24 h by Annexin V/PI flow cytometry. Horizontal lines represent the mean. **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$. (B) Western blot analysis after stimulation of CLL cells for 30 minutes with anti-IgM in the presence of 2 μM NVP-BKM120. A representative case was shown (CLL n. 4). (C) Primary CLL cells (n=6) were incubated with 2 μM NVP-BKM120 in presence or absence of anti-IgM for 6 h. Analysis of BIM was then determined by RT-PCR and Western blot analysis. Mean \pm SEM of the cases analyzed. *, $P < 0.05$. A representative case was shown (CLL n. 4). (D) Analysis of mRNA expression by RT-PCR of CCL3 and CCL4 chemokines in 4 CLL cases incubated simultaneously with NVP-BKM120 and anti-IgM for 6 h. Mean \pm SEM of the cases analyzed. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$.

3.70 ± 1.83 , $*P < 0.05$). These findings highlight NVP-BKM120 ability to inhibit BCR-derived responses in CLL cells.

NVP-BKM120 induces cytotoxicity in the presence of microenvironment survival signals on CLL cells

It is well documented that stromal microenvironment contributes to CLL cell proliferation, survival and drug resistance.² Consistent with previous results,²⁹ we observed that co-culture with the stromal cell line HS-5 protected CLL cells from spontaneous apoptosis, thus cell viability in control samples was $67.80\% \pm 9.86$ and increased up to $81.93\% \pm 6.0$ after HS-5 co-culture (***, $P < 0.001$, Figure 5A). NVP-BKM120 treatment (2 μM, 24 h) of CLL cells induced cytotoxicity both with and without HS-5 co-culture (Figure 5A; **, $P < 0.01$). At the molecular level, NVP-BKM120 efficiently down-regulated stroma-induced phospho-Akt, phospho-FoxO3a and Mcl-1 expression (Figure 5B), and still induced Bim at both mRNA (**, $P < 0.01$) and protein levels (Figure 5C).

From this observation, we further evaluated whether NVP-BKM120 could enhance CLL cell killing when these cells were co-cultured with HS-5 in the presence of fludarabine and bendamustine, both drugs currently used in CLL treatment. Figure 5D depicts the mean relative viabilities of CLL cells co-treated with NVP-BKM120 1 μM, a dose that did not affect HS-5 cells viability (*data not shown*), and fludarabine (0.5 μg/mL) or bendamustine (10 μM) for 48 h. Interestingly, the combination of both agents was significantly more effective than single drug alone, both in

the presence and absence of HS-5 (***, $P < 0.001$). Thus, a synergistic effect was observed both in combination with fludarabine (CI: 0.598) and bendamustine (CI: 0.675) without stroma, and also in co-culture with stromal cells (CI: 0.471 for fludarabine and CI: 0.462 for bendamustine).

NVP-BKM120 inhibits CXCL12-induced CLL migration and actin polymerization

CXCL12 is a chemokine secreted by different types of stromal cells that has a direct pro-survival effect on CLL cells and may guide migration of CLL cells to the stroma microenvironment.³⁰ Thus, we sought to analyze the effect of NVP-BKM120 in the presence of CXCL12. Figure 6A indicates that NVP-BKM120 2 μM overcame CXCL12 (200 ng/mL) stimulation and induced apoptosis with the same efficiency in CXCL12-stimulated cells (***, $P < 0.001$) as in non-stimulated CLL cells (***, $P < 0.001$).

To assess the effect of NVP-BKM120 on the migratory capacity of CLL cells induced by CXCL12, CLL cells were assayed for chemotaxis toward CXCL12 (200 ng/mL) after 1 h of pre-incubation with NVP-BKM120 2 μM. Figure 6B shows that NVP-BKM120 significantly reduced the number of migrating CLL cells from peripheral blood in the presence of the chemokine ($43.77\% \pm 21.93$ of inhibition, *, $P < 0.05$). Significant inhibition of migration cells (*, $P < 0.05$) were also observed in the presence of CXCL12 in CLL cells derived from bone marrow ($26.04\% \pm 14.32$ of inhibition, Figure 6C) and lymph node ($27.61\% \pm 19.67$ of inhibition, Figure 6D).

As cell migration in response to chemokines requires

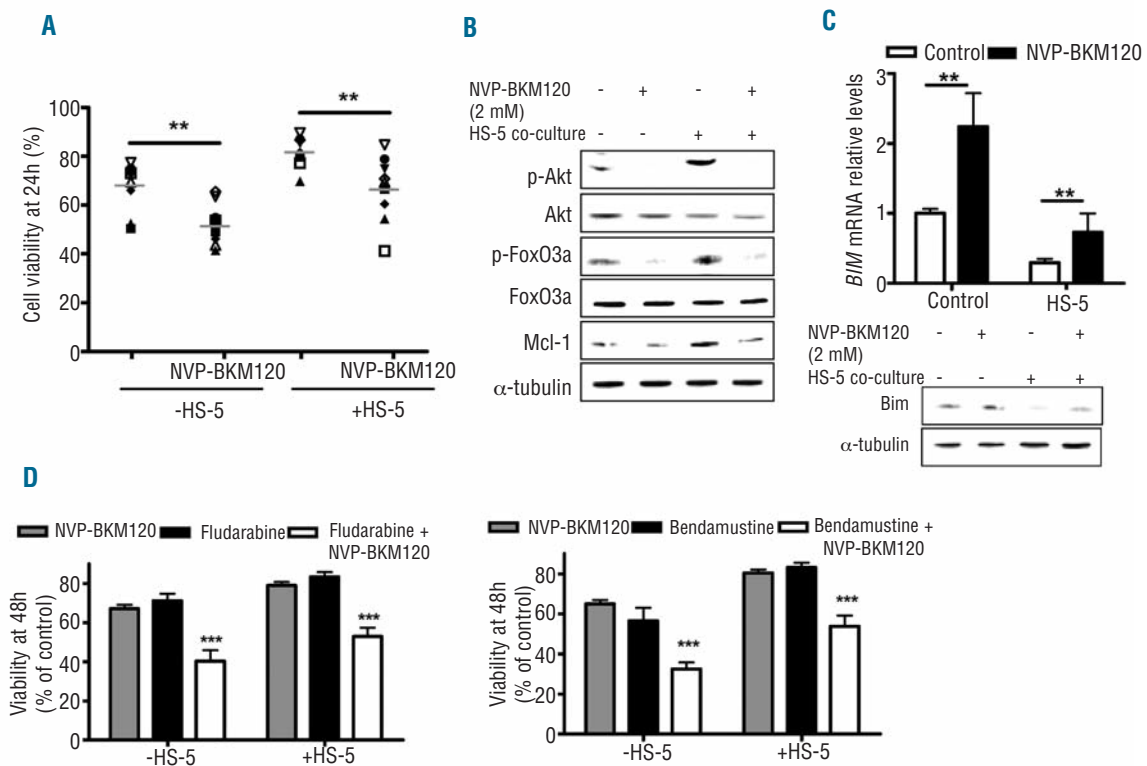


Figure 5. NVP-BKM120 induces cytotoxicity in the presence of microenvironment survival signals on CLL cells. **(A)** Primary CLL cells (n=8) were co-cultured with or without HS-5 and incubated with 2 μ M NVP-BKM120. Cell viability was assessed at 24 h by Annexin V/PI flow cytometry. Horizontal lines represent the mean. **, $P < 0.01$. **(B)** Western blot analysis after co-culture of CLL cells with HS-5 in the presence of 2 μ M NVP-BKM120 for 6 h. A representative case was shown (CLL n. 4). **(C)** Primary CLL cells (n=8) co-cultured with or without HS-5 were incubated with 2 μ M NVP-BKM120 for 6 h. Analysis of Bim was then determined by RT-PCR and Western blot analysis. A representative case was shown (CLL n.4). Mean \pm SEM of the cases analyzed. **, $P < 0.01$. **(D)** CLL cells (n=6) were simultaneously incubated with 1 μ M NVP-BKM120 and fludarabine (0.5 μ g/mL) or bendamustine (10 μ M) with or without stroma. Viability at 48 h was calculated relative to the respective untreated control, with or without stroma. Mean \pm SEM of the cases analyzed. ***, $P < 0.001$.

actin polymerization, we therefore analyzed the effects of NVP-BKM120 on this cellular response. As shown in Figure 6E, CXCL12 induced a notable increase in actin polymerization at 15 seconds (s) of stimulation that was significantly decreased with NVP-BKM120 2 μ M after only 60 s (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$). These data suggest that NVP-BKM120 could block CXCL12-induced CLL chemotaxis and actin polymerization.

Discussion

BCR signaling plays an important role in the CLL pathogenesis and disease progression, as promotes maintenance and expansion of tumoral cells.³¹ Besides from BCR signalling, many other factors have been identified to enhance CLL cell survival, such as Toll-like receptors, cytokines, chemokines, CD40, BAFF, integrins and components of extracellular matrix.³ Many of these factors activate similar intracellular signalling pathways, being one of the most prominent the PI3K/Akt/mTOR pathway. In our study, we have examined the response of primary CLL cells to the PI3K inhibitor NVP-BKM120. Our data indicate that NVP-BKM120 selectively activates the intrinsic apoptotic pathway in B cells and that its cytotoxic activity in CLL occurs independently of the most common prognostic markers such as mutational status of *IGHV*, *ZAP-70* and *CD38* expression, the adverse cytogenetic

alterations and the new recurrent mutations described in CLL cells.^{21,22} Furthermore, this study suggests that NVP-BKM120 mediates cytotoxicity both by directly inhibiting PI3K signalling in CLL cells and by disabling the supportive effect of many microenvironmental factors including co-culture with stromal cells, activation of the BCR and of CXCL12. More specifically, NVP-BKM120 is able to induce cytotoxicity despite IgM-mediated stimulation of BCR and to inhibit BCR-dependent induction of the T-cell attracting chemokines CCL3 and CCL4. In addition, we show that NVP-BKM120 sensitizes CLL cells to cytotoxic drugs such as fludarabine and bendamustine even in the presence of protective bone marrow-derived stromal cells. Several PI3K inhibitors are in pre-clinical studies and only few results have been reported in clinical trials. Among them, a phase I study of the PI3K δ inhibitor GS-1101 showed an overall response (OR) of 26%. However, 80% of patients had a reduction in lymphadenopathy by $\geq 50\%$.¹⁰ Interestingly, it has recently been reported that combination of GS-1101 with rituximab and/or bendamustine induces an OR higher than 78%.³² In line with this, clinical responses to SYK³³ and BTK³⁴ inhibitors in CLL are also characterized by a rapid mobilization of tumoral cells from nodal masses to peripheral circulation, with a significant decrease in lymphadenopathies and splenomegaly and an increase in the number of lymphocytes in peripheral blood. Consistently, we observed that NVP-BKM120 might also be effective in cells from lymph

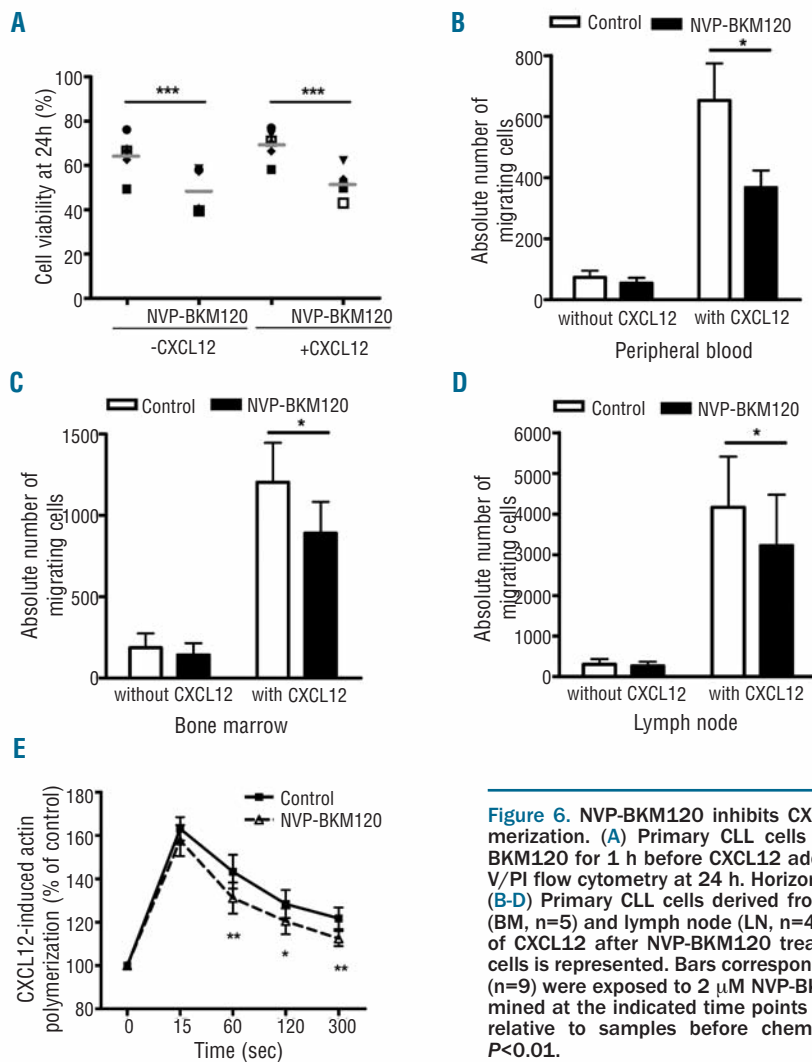


Figure 6. NVP-BKM120 inhibits CXCL12-induced CLL migration and actin polymerization. (A) Primary CLL cells (n=6) were pre-incubated with 2 μ M NVP-BKM120 for 1 h before CXCL12 addition. Cell viability was assessed by Annexin V/PI flow cytometry at 24 h. Horizontal lines represent the mean. ***, $P < 0.001$. (B-D) Primary CLL cells derived from peripheral blood (PB, n=9), bone marrow (BM, n=5) and lymph node (LN, n=4) were assayed for migration in the presence of CXCL12 after NVP-BKM120 treatment as above. Total number of migrating cells is represented. Bars correspond to the mean \pm SEM. *, $P < 0.05$. (E) CLL cells (n=9) were exposed to 2 μ M NVP-BKM120 for 1 h and F-actin content was determined at the indicated time points after CXCL12 addition. Results are displayed relative to samples before chemokine stimulation (100%). *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$.

nodes and bone marrow, indicating that this compound could induce cytotoxicity to CLL cells from these compartments by deprivation from their supportive tissue microenvironment. We also found that NVP-BKM120 could inhibit CLL cell migration and signaling responses to CXCL12. These effects of NVP-BKM120 on cell migration and actin polymerization could cause interference with the cell trafficking and homing of CLL cells.

Importantly, it has recently been reported that NVP-BKM120 was 3.6 fold more toxic than GS-1101 in primary CLL cells *in vitro*,¹⁶ thus confirming a crucial role for the non-delta PI3K isoforms in CLL to antagonize stromal cell-derived migration, survival, and drug-resistance signals³⁵ and pointing out the importance to target different isoforms to overcome possible redundant functions. In this sense, it has been reported that expression of p110 isoform can maintain constitutive PI3K signaling despite p110 inhibition.³⁶

The inhibition of PI3K by NVP-BKM120 results in dephosphorylation of Akt and subsequent regulation of a number of proteins including FoxO3a. The tumor suppressor genes of the FoxO subfamily of Forkhead transcription factors that includes FoxO3a (or FKHL1), FoxO1a (or FKHR), and FoxO4a (or AFX) are critical effectors down-

stream of Akt.³⁷ Activation of FoxO3a by decreasing its phosphorylation and increasing its nuclear content can up-regulate the expression of genes that are involved in either apoptosis or cell cycle arrest in different types of cells.^{25,38} Thus, increasing FoxO activity appears as a promising therapeutic strategy.³⁹ FoxO3a is an important regulator of Bim expression⁴⁰⁻⁴² and alterations in the Akt-FoxO3a axis have been described to affect Bim expression in several models.^{43,44} Recently, it has been reported that plasmid-based overexpression of constitutively active FoxO3a in CLL cells reduced their survival and induced expression of Bim and p27.⁴⁵ According to this finding, we found that NVP-BKM120 is able to induce Bim in CLL cells, even in the presence of anti-IgM or co-culture with stromal cells. Moreover, Bim induction is functionally important for NVP-BKM120-mediated apoptosis in CLL cells, as an siRNA-mediated approach to knockdown *BIM* demonstrates that Bim effectively contributes to cell death after NVP-BKM120 treatment.

Bim functions as a tumor suppressor in B-cell malignancies and is a key determinant of BCR-induced apoptosis in normal B cells, where it is required for the deletion of autoreactive cells *in vivo*.⁴⁶ Moreover, Bim is the preferred dimerization partner of Mcl-1, a key target for survival sig-

nals in CLL cells. High Mcl-1 expression and a low Bim/Mcl-1 ratio is a predictive of inferior response to chemotherapeutic agents.^{47,48}

Our results show that Mcl-1 is induced both in cells stimulated with anti-IgM and co-cultured with stromal cells, thereby playing an important role in microenvironment-derived signaling. In this context, it has been reported that disease in the bone marrow is less responsive to the BH3-mimetic ABT-263, which may be due to upregulation of Mcl-1 in CLL cells in contact with stroma and a decrease in Bim expression.^{46,49} In our study, NVP-BKM120 induction of Bim may be able to neutralize high Mcl-1 expression and, as NVP-BKM120 also inhibits Mcl-1 translation, it accentuates even more the Bim/Mcl-1 ratio, leading to the activation of the mitochondrial apoptotic pathway. Recently, it has been reported that the combination of PI3K/Akt/mTOR inhibitors and BH3 mimetics enhances PI3K inhibition-induced apoptosis through a Bim-dependent mechanism in acute myeloid leukemia.⁵⁰ Consistently, we also found that NVP-BKM120 exerts a synergistic effect with the BH3-mimetic ABT-263, supporting the role of the Bcl-2 family of proteins in the NVP-BKM120 induced apoptosis.

Overall, our present findings establish that NVP-BKM120 effectively inhibits the PI3K signaling pathway and disturbs the protective effect of the tumor microenvironment with the subsequent apoptosis induction of CLL cells. Our data provide mechanistic insight into the cytotoxic activity of this PI3K inhibitor in CLL cells, indicating that induction of Bim is one of the key points in NVP-BKM120-mediated cytotoxicity. In addition, NVP-BKM120 inhibits CLL cell migration and actin polymerization, which may be particularly important in mobilizing

CLL cells from sanctuary sites. We provide here a strong rationale for undertaking clinical trials of NVP-BKM120 in CLL patients alone or in combination therapies.

Acknowledgments

The authors thank Jocabed Roldán, Laura Jiménez and Sandra Cabezas for expert technical assistance. NVP-BKM120 was kindly provided by Novartis. This work was carried out at the Esther Koplowitz Center, Barcelona.

Funding

This study was supported by grants from Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF 09/9503 and SAF 12/31242), Redes Temáticas de Investigación Cooperativa de Cáncer from the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Spanish Ministry of Economy and Competitiveness & European Regional Development Fund (ERDF) "Una manera de hacer Europa" RD2006/20/014, RD2006/20/039, RD12/0036/0004, RD12/0036/0036; RD12/0036/0023 and Generalitat de Catalunya 2009SGR967 (DC). ML-G has a contract from Fundación Científica de la Asociación Española contra el Cáncer. LR, SX-T and AM are recipients of predoctoral fellowships from IDIBAPS, FPU and FPI from Ministerio de Ciencia e Innovación, respectively. PP-G holds a contract from Ramón y Cajal program (RYC2009-05134) and a grant from Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF 11/29326). GR holds a contract from Miguel Servet program and a grant from Fondo de Investigación Sanitaria (PI09/00060 and PI12/01847).

Authorship and Disclosures

Information on authorship, contributions, and financial & other disclosures was provided by the authors and is available with the online version of this article at www.haematologica.org.

References

- Gaidano G, Foa R, Dalla-Favera R. Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest*. 2012;122(10):3432-8.
- Burger JA. Targeting the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia is changing the therapeutic landscape. *Curr Opin Oncol*. 2012;24(6):643-9.
- Wiestner A. Emerging role of kinase-targeted strategies in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2012;120(24):4684-91.
- Ringshausen I, Schneller F, Bogner C, Hipp S, Duyster J, Peschel C, et al. Constitutively activated phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) is involved in the defect of apoptosis in B-CLL: association with protein kinase Cdelta. *Blood*. 2002;100(10):3741-8.
- Vanhaesebroeck B, Guillermet-Guibert J, Graupera M, Bilanges B. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(5):329-41.
- Baracho GV, Miletic AV, Omori SA, Cato MH, Rickert RC. Emergence of the PI3-kinase pathway as a central modulator of normal and aberrant B cell differentiation. *Curr Opin Immunol*. 2011;23(2):178-83.
- Polak R, Buitenhuis M. The PI3K/PKB signaling module as key regulator of hematopoiesis: implications for therapeutic strategies in leukemia. *Blood*. 2012;119(4):911-23.
- Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*. 2007;129(7):1261-74.
- Hoellenriegel J, Meadows SA, Sivina M, Wierda WG, Kantarjian H, Keating MJ, et al. The phosphoinositide 3'-kinase delta inhibitor, CAL-101, inhibits B-cell receptor signaling and chemokine networks in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011;118(13):3603-12.
- Coutre SE, Byrd JC, Furman RR, et al. Phase I study of CAL-101, an isoform-selective inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase P110(delta), in patients with previously treated chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. (ASCO Meetings Abstracts). 2011;29(15):6631.
- Ramadan F, Bolland DJ, Garcon F, Emery JL, Vanhaesebroeck B, Corcoran AE, et al. The PI3K isoforms p110alpha and p110delta are essential for pre-B cell receptor signaling and B cell development. *Sci Signal*. 2010;3(134):ra60.
- Brachmann SM, Kleylein-Sohn J, Gaulis S, Kauffmann A, Blommers MJ, Kazic-Legueux M, et al. Characterization of the mechanism of action of the pan class I PI3K inhibitor NVP-BKM120 across a broad range of concentrations. *Mol Cancer Ther*. 2012;11(8):1747-57.
- Maira SM, Pecchi S, Huang A, Burger M, Knapp M, Sterker D, et al. Identification and characterization of NVP-BKM120, an orally available pan-class I PI3-kinase inhibitor. *Mol Cancer Ther*. 2012;11(2):317-28.
- Koul D, Fu J, Shen R, LaFortune TA, Wang S, Tiao N, et al. Antitumor activity of NVP-BKM120--a selective pan class I PI3 kinase inhibitor showed differential forms of cell death based on p53 status of glioma cells. *Clin Cancer Res*. 2012;18(1):184-95.
- Zheng Y, Yang J, Qian J, Zhang L, Lu Y, Li H, et al. Novel phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor NVP-BKM120 induces apoptosis in myeloma cells and shows synergistic anti-myeloma activity with dexamethasone. *J Mol Med (Berl)*. 2012;90(6):695-706.
- Amrein L, Shawi M, Grenier J, Aloyz R, Panasci L. The phosphatidylinositol-3 kinase I inhibitor BKM120 induces cell death in B-chronic lymphocytic leukemia cells in vitro. *Int J Cancer*. 2013;133(1):247-52.
- Mueller A, Bachmann E, Linnig M, Khillimberger K, Schimanski CC, Galle PR, et al. Selective PI3K inhibition by BKM120 and BEZ235 alone or in combination with chemotherapy in wild-type and mutated human gastrointestinal cancer cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2012;69(6):1601-15.
- Walsh K, McKinney MS, Love C, Liu Q, Fan A, Patel A, et al. PAK1 Mediates Resistance to PI3K Inhibition in Lymphomas. *Clin Cancer Res*. 2013;19(5):1106-15.
- Bendell JC, Rodon J, Burris HA, de Jonge M, Verweij J, Birlle D, et al. Phase I, dose-escalation study of BKM120, an oral pan-Class I PI3K inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol*. 2012;30(3):282-90.

20. Ghia P, Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, Stilgenbauer S, Stevenson F, et al. ERIC recommendations on IGHV gene mutational status analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2007; 21(1):1-3.
21. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordonez GR, Villamor N, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*. 2011;475(7354):101-5.
22. Quesada V, Conde L, Villamor N, Ordonez GR, Jares P, Bassaganyas L, et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet*. 2012; 44(1):47-52.
23. Xargay-Torrent S, Lopez-Guerra M, Saborit-Villarroya I, Rosich L, Campo E, Roue G, et al. Vorinostat-induced apoptosis in mantle cell lymphoma is mediated by acetylation of proapoptotic BH3-only gene promoters. *Clin Cancer Res*. 2011; 17(12):3956-68.
24. Rosich L, Xargay-Torrent S, Lopez-Guerra M, Campo E, Colomer D, Roue G. Counteracting autophagy overcomes resistance to everolimus in mantle cell lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2012;18(19):5278-89.
25. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*. 1999; 96(6):857-68.
26. Martelli AM, Evangelisti C, Chappell W, Abrams SL, Basecke J, Stivala F, et al. Targeting the translational apparatus to improve leukemia therapy: roles of the PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathway. *Leukemia*. 2011;25(7):1064-79.
27. Xargay-Torrent S, Lopez-Guerra M, Montraveta A, Saborit-Villarroya I, Rosich L, Navarro A, et al. Sorafenib inhibits cell migration and stroma-mediated bortezomib resistance by interfering B-cell receptor signaling and protein translation in mantle cell lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2013;19(3):586-97.
28. Huber S, Oelsner M, Decker T, zum Buschenfelde CM, Wagner M, Lutzny G, et al. Sorafenib induces cell death in chronic lymphocytic leukemia by translational downregulation of Mcl-1. *Leukemia*. 2011; 25(5):838-47.
29. Lopez-Guerra M, Xargay-Torrent S, Perez-Galan P, Saborit-Villarroya I, Rosich L, Villamor N, et al. Sorafenib targets BCR kinases and blocks migratory and microenvironmental survival signals in CLL cells. *Leukemia*. 2012;26(6):1429-32.
30. Burger JA, Burger M, Kipps TJ. Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells. *Blood*. 1999; 94(11):3658-67.
31. Woyach JA, Johnson AJ, Byrd JC. The B-cell receptor signaling pathway as a therapeutic target in CLL. *Blood*. 2012;120(6):1175-84.
32. Coutre SE, Leonard JP, Furman RR, Barrientos JC, Vos S, Flinn IW, et al. Combinations of the Selective Phosphatidylinositol 3-Kinase-Delta (PI3Kdelta) Inhibitor GS-1101 (CAL-101) with Rituximab and/or Bendamustine Are Tolerable and Highly Active in Patients with Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL): Results From a Phase I Study. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*. 2012;120:191.
33. Friedberg JW, Sharman J, Sweetenham J, Johnston PB, Vose JM, Lacasce A, et al. Inhibition of Syk with fostamatinib disodium has significant clinical activity in non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2010;115(13):2578-85.
34. Advani RH, Buggy JJ, Sharman JP, Smith SM, Boyd TE, Grant B, et al. Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) has significant activity in patients with relapsed/refractory B-cell malignancies. *J Clin Oncol*. 2013;31(1):88-94.
35. Niedermeier M, Hennessy BT, Knight ZA, Henneberg M, Hu J, Kurtova AV, et al. Isoform-selective phosphoinositide 3'-kinase inhibitors inhibit CXCR4 signaling and overcome stromal cell-mediated drug resistance in chronic lymphocytic leukemia: a novel therapeutic approach. *Blood*. 2009;113(22):5549-57.
36. Iyengar S, Clear A, Bodor C, Maharaj L, Lee A, Calaminici M, et al. P110alpha-mediated constitutive PI3K signaling limits the efficacy of p110delta-selective inhibition in mantle cell lymphoma, particularly with multiple relapse. *Blood*. 2013;121(12):2274-84.
37. Fu Z, Tindall DJ. FOXOs, cancer and regulation of apoptosis. *Oncogene*. 2008;27(16):2312-9.
38. Yang JY, Hung MC. A new fork for clinical application: targeting forkhead transcription factors in cancer. *Clin Cancer Res*. 2009;15(3):752-7.
39. Myatt SS, Lam EW. The emerging roles of forkhead box (Fox) proteins in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(11):847-59.
40. Gilley J, Coffey PJ, Ham J. FOXO transcription factors directly activate bim gene expression and promote apoptosis in sympathetic neurons. *J Cell Biol*. 2003;162(4):613-22.
41. Stahl M, Dijkers PF, Kops GJ, Lens SM, Coffey PJ, Burgering BM, et al. The forkhead transcription factor FoxO regulates transcription of p27Kip1 and Bim in response to IL-2. *J Immunol*. 2002; 168(10):5024-31.
42. Dijkers PF, Medema RH, Lammers JW, Koenderman L, Coffey PJ. Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr Biol*. 2000;10(19):1201-4.
43. Sunter A, Fernandez de MS, Stahl M, Brosens JJ, Zoumpoulidou G, Saunders CA, et al. FoxO3a transcriptional regulation of Bim controls apoptosis in paclitaxel-treated breast cancer cell lines. *J Biol Chem*. 2003; 278(50):49795-805.
44. Essafi A, Fernandez de MS, Hassen YA, Soeiro I, Mufti GJ, Thomas NS, et al. Direct transcriptional regulation of Bim by FoxO3a mediates STI571-induced apoptosis in Bcr-Abl-expressing cells. *Oncogene*. 2005;24(14):2317-29.
45. Essafi M, Baudot AD, Mouska X, Cassuto JP, Ticchioni M, Deckert M. Cell-penetrating TAT-FOXO3 fusion proteins induce apoptotic cell death in leukemic cells. *Mol Cancer Ther*. 2011;10(1):37-46.
46. Paterson A, Mockridge CI, Adams JE, Krysov S, Potter KN, Duncombe AS, et al. Mechanisms and clinical significance of BIM phosphorylation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2012;119(7):1726-36.
47. Pepper C, Lin TT, Pratt G, Hewamana S, Brennan P, Hiller L, et al. Mcl-1 expression has in vitro and in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and is associated with other poor prognostic markers. *Blood*. 2008;112(9):3807-17.
48. Alonso R, Lopez-Guerra M, Upshaw R, Bantia S, Smal C, Bontemps F, et al. Forodesine has high antitumor activity in chronic lymphocytic leukemia and activates p53-independent mitochondrial apoptosis by induction of p73 and BIM. *Blood*. 2009; 114(8):1563-75.
49. Davids MS, Deng J, Wiestner A, Lannutti BJ, Wang L, Wu CJ, et al. Decreased mitochondrial apoptotic priming underlies stroma-mediated treatment resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2012;120(17):3501-9.
50. Rahmani M, Aust MM, Attkisson E, Williams DC Jr, Ferreira-Gonzalez A, Grant S. Dual Inhibition of Bcl-2 and Bcl-xL Strikingly Enhances PI3K Inhibition-Induced Apoptosis in Human Myeloid Leukemia Cells through a. *Cancer Res*. 2013;73(4):1340-51.

SUPPLEMENTARY DATA

SUPPLEMENTARY METHODS

Isolation and culture of primary cells

Peripheral blood mononuclear cells or bone marrow aspirates from CLL patients were isolated by Ficoll-paque sedimentation (GE-healthcare). Tumor cells from lymph nodes were obtained after squirting with RPMI 1640 (Life technologies) culture medium using a fine needle. Cells were either used directly or cryopreserved in liquid nitrogen in RPMI 1640 containing 10% DMSO (Sigma) and 60% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; Life technologies). Manipulation due to freezing/thawing did not influence cell response. After thawing, cells were cultured in RPMI 1640, supplemented with 10% FBS, 2mM glutamine (Life technologies) and 50 μ g/mL penicillin-streptomycin (Life technologies), in a humidified atmosphere at 37 $^{\circ}$ C containing 5% carbon dioxide.

Antibodies

Membranes were probed with the following primary antibodies: phospho-mTOR (Ser2448), mTOR, phospho-Akt (Ser473), phospho-S6 ribosomal protein (S6RP; Ser235/236), S6RP (clone 54D2), phospho-4E-BP1 (Thr37/46), 4E-BP1 (clone 53H11), phospho-eIF4E (Ser209), eIF4E, phospho-FoxO3a (Thr32) (clone 4G6) and Akt from Cell Signaling Technology, FoxO3a (Upstate, Millipore), Mcl-1 (clone S-19), Bcl-X_L (clone S-18) and Bcl-2 (clone 100) from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz), and Bim (extra-large isoform) from Calbiochem (Darmstadt). HRP-labeled anti-mouse IgG (Sigma) and anti-rabbit IgG (Sigma and Cell Signaling Technologies) were used as secondary antibodies. Equal protein loading was confirmed by probing membranes with anti- β -actin or anti- α -tubulin antibodies (Sigma).

PIP₃ ELISA assay

PI3K activity was determined by measuring the amount of PIP₃ extracted from CLL cells, according to manufacturer's instructions (Echelon Biosciences). Briefly, PIP₃ were extracted from cell samples and incubated with a PIP₃ detector protein for 1 hour at room temperature. After this time, the mixture was transferred to the PIP₃-coated microplate for competitive binding and allowed to incubate 1 hour at room

temperature. Plates were washed and then incubated with a peroxidase-linked secondary detector for 45 minutes. 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine colorimetric substrate was added for 5-10 minutes at which time reactions were stopped upon H₂SO₄ addition. The PIP₃ detector protein binding was analyzed at 450 nM. The colorimetric signal is inversely proportional to the amount of PIP₃ extracted from cells and cellular PIP₃ products were estimated using a standard curve. Results are displayed relative to untreated controls.

mRNA quantification by real-time PCR

Total RNA was extracted using TRIZOL method (Life technologies) according to manufacturer's instructions. One microgram of RNA was retrotranscribed to cDNA using random primers and the M-MLV reverse transcriptase (Life technologies). *BIM*, *MCL-1*, *CCL3* and *CCL4* mRNA expression levels were analyzed in duplicate with predesigned Assay-On-Demand probes (Life Technologies) on a Step-One Plus™ Real Time PCR System (Applied Biosystems) by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). The relative expression of each gene was quantified by the comparative cycle threshold (C_t) method ($\Delta\Delta C_t$) using β -actin as endogenous control. mRNA expression levels are given in arbitrary units, taking as a reference the control sample (untreated cells).

RNA interference assay

CLL cells (2×10^6 cells/mL) were cultured without antibiotics and washed with FBS-free RPMI medium. 5×10^6 cells were then electroporated with a Nucleofector II device (Lonza) in 100 μ L of Solution V (Lonza) containing either 5 μ M of *BIM* Silencer Select Predesigned siRNA or 5 μ M of a nonsilencing negative control (Life technologies). U-015 Nucleofector program was used. After transfection, cells were transferred to culture plates for 6 hours before experiments were set up.

BCR stimulation by anti-immunoglobulin M antibodies cross-linking

After 1.5 hours of starving in FBS-free RPMI 1640 culture medium, CLL cells (10^7 cells/mL) were reacted at 4°C for 30 minutes with 25 μ g/mL anti-IgM-biotin (Jackson Immunoresearch Laboratories) followed by the addition of 10 μ g/mL streptavidin (Jackson Immunoresearch Laboratories) for 20 minutes. Cells were then transferred to

37°C and collected after 30 minutes for further analysis. When indicated, cells were treated with NVP-BKM120 simultaneously to the addition of anti-IgM.

Stromal cell coculture

The human bone marrow-derived stromal cell line HS-5 (ATCC) was cultured in DMEM medium (Life technologies) supplemented with 10 % heat-inactivated FBS, 2 mM glutamine, 50 µg/mL penicillin-streptomycin (Life technologies). HS-5 cells were seeded in 24-well plates at 2×10^5 cells/mL the day before the experiment. The next day, medium was removed and CLL cells (2×10^6 cells, ratio 1:10) were added and cultured for the indicated times in the presence or absence of NVP-BKM120. CLL cells were collected by carefully rinsing the well without disturbing the HS-5 monolayer and then analyzed for cell viability.

Migration assays

CXCL12-induced migration was evaluated in 24-well chemotaxis plates containing transwell polycarbonate inserts of 6.5 mm diameter and 5 µm pore size (Corning). A total of 100 µL cell suspensions at 5×10^6 cells/mL pretreated or not with NVP-BKM120 for 1 hour were added to the top chamber of the transwells and 600 µL of RPMI 1640 with or without human recombinant CXCL12 (200 ng/mL; Peprotech) to the lower chamber. After 4 hours, 100 µL were collected in triplicate from each lower chamber and counted in a FACScan flow cytometer for 1 minute at constant flow rate.

Actin polymerization assays

CLL cells were serum-starved for 1.5 hours in FBS-free RPMI at 10^7 cells/mL. Then, cells were diluted to 2×10^6 cells/mL in RPMI with 0.5% BSA and treated with NVP-BKM120 for 1 additional hour. Samples were stimulated with 200 ng/mL of CXCL12 and at the indicated time points, 400 µL of the cell suspension were collected and added to 100 µL of the staining solution (2.5 ng/mL phalloidin-tetramethyl rhodamine isothiocyanate, 2.5 mg/mL of L- α -lysophosphatidylcholine (Sigma) and 5% paraformaldehyde (Aname) for 20 minutes at 37°C. Samples were analyzed by acoustic cytometry (Attune; Life Technologies) and results were plotted relative to the mean fluorescence of the sample before the addition of CXCL12.

Table S1.- Characteristics of CLL patients

Patient n°	Age at diagnosis	Gender	Source	Binet stage	Previous treatment	%CD19/CD5†	IgVH status‡	%ZAP-70†	%CD38†	Cytogenetic alterations (FISH)§	Mutations†	% response (2µM) 48h
CLL 1	53	M	PB	C	R-FCM, R-CHOP	97	UM	42	57	91% 13q del	normal	7.5
CLL 2	72	M	PB	A	No	93	M	0.3	0	18% 13q del	normal	55
CLL 3	51	M	PB	B	No	96	UM	17	63	94% 11q del	normal	55.2
CLL 4	73	M	PB	A	No	96	UM	67	1	44% 13q del	normal	45.4
CLL 5	73	M	PB	A	No	97	UM	9	8	normal	normal	28.6
CLL 6	46	M	PB	B	No	97	UM	5	1	38% 13q del; 15% 11q del; 25% 17p del	normal	23
CLL 7	63	F	PB	B/C	Chlorambucil	95	M	50	6	94% 13q del	normal	12.7
CLL 8	58	M	PB	A	No	95	M	8	3	normal	normal	23.2
CLL 9	64	M	PB	A	No	97	M	0.6	0.5	normal	normal	35.4
CLL 10	51	M	PB	B/C	FCM, R-FCM	93	M	13	53	normal	normal	26.3
CLL 11	57	M	PB	C	FCM	99	UM	77	50	97% 11q del	normal	16.5
CLL 12	72	F	PB	B/C	Yes	91	UM	55	100	85% 13q del	NOTCH1 mut	35
CLL 13	77	F	PB	B	FC	82	UM	73	46	90% 13q del; 80% 11q del	NOTCH1 mut	30
CLL 14	70	M	PB	A	R-FCM	93	M	0.8	7	normal	normal	59.9
CLL 15	60	M	PB	B	No	79	UM	35	40	75% 11q del	normal	34.8
CLL 16	76	M	PB	A	No	91	UM	27	14	normal	normal	34.3
CLL 17	70	F	PB	C	Fludarabine, chlorambucil	98	UM	34	3	normal	normal	38
CLL 18	72	M	PB	B	RFC	95	UM	7	10	93% 11q del; 78% 13q del	normal	36.9
CLL 19	82	M	PB	A	No	95	M	3	53	normal	normal	11
CLL 20	61	M	PB	A	FCM, CHOP-like, R-FCM	92	M	2	18	31% 13q del	SF3B1 mut	15.9
CLL 21	76	M	PB	B	Chlorambucil	93	M	5	70	normal	SF3B1 mut; NOTCH1 mut	23
CLL 22	60	M	PB	A	Chlorambucil, R-FCM	95	M	0	1	74% 13q del	normal	7.3
CLL 23	76	F	PB	A	Chlorambucil	86	M	26	44	90% 13q del	NOTCH1 mut	33.5
CLL 24	50	F	PB	A	No	95	M	25	0.4	70% 13q del	normal	28.1
CLL 25	55	M	PB	B	FCM, R-FCM	97	UM	40	44	89% 11q del	normal	31
CLL 26	54	M	PB	A	No	96	M	12	2	75% 13q del; 21% 17p del	MYD88 mut	39.7
CLL 27	75	M	PB	A	No	95	UM	18	20	12% 13q del	normal	8.5
CLL 28	57	F	PB	B	No	92	M	1	2	76% 13q del	normal	50.6
CLL 29	49	M	PB	A	No	89	M	2	10	28% 13q del	normal	26.3
CLL 30	69	M	PB	A	No	93	M	1	16	45% trisomy 12	normal	21.5
CLL 31	66	M	PB*	B	Chlorambucil, R-FCM	98	M	2	0.7	90% 13q del; 73% trisomy 12	normal	61.5
CLL 32	78	F	PB	A	No	94	M	1	0.2	18% 13q del	normal	33
CLL 33	83	M	PB	A	Chlorambucil	81	UM	0.8	0	19% 17p del	normal	17.6
CLL 34	67	M	PB	C	No	96	UM	7	0.6	90% 11q del	normal	20.6
CLL 35	74	M	PB*	B	CHOP-like	96	UM	24	50	68% trisomy 12	NOTCH1 mut	71.4
CLL 36	53	M	PB*	B	No	96	UM	7	95	normal	normal	26.2
CLL 37	46	M	PB	A	No	80	UM	70	30	34% 13q del	NOTCH1 mut	37.9

Abbreviations: nd: not determined; M: male; F: female; PB: peripheral blood; BM: bone marrow; LN: lymph node; UM: unmutated; M: mutated; del: deletion; mut: mutation

† quantified by flow cytometry

‡ assessed by direct sequencing

* Bone marrow or lymph node samples were also assessed

Segon article

Contrarestar l'autofàgia supera la resistència a everolimus en el limfoma de cèl·lules del mantell

Laia Rosich, Sílvia Xargay-Torrent, Mónica López-Guerra, Elías Campo, Dolors Colomer* i Gaël Roué*

Unitat d'Hematopatologia, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Barcelona, Espanya

*Aquests autors comparteixen co-direcció

Clin Cancer Res. 2012 Oct 1;18(19):5278-89

Resum

Objectiu: El limfoma de cèl·lules del mantell és una agressiva neoplàsia de limfòcits B que respon poc a la quimioteràpia convencional i té una curta supervivència. La via de PI3K/AKT/mTOR es troba constitutivament activada en les cèl·lules de MCL, de manera que la inhibició de mTOR és una estratègia terapèutica atractiva. Els primers estudis clínics d'everolimus, un inhibidor de mTORC1, han mostrat una resposta significativa en pacients de MCL en recaiguda. El nostre objectiu s'ha centrat en analitzar el mecanisme relacionat amb la resistència/sensibilitat a everolimus en cèl·lules de MCL.

Disseny experimental: La sensibilitat a everolimus es va analitzar en 8 línies cel·lulars i en 11 mostres primàries de MCL mitjançant l'avaluació de l'apoptosi per citometria de flux, assaigs de proliferació cel·lular i anàlisi del cicle cel·lular. El mecanisme d'acció d'everolimus es va determinar per tècniques de citometria de flux i per *Western blot*. En particular, l'estudi de l'autofàgia es va dur a terme mitjançant l'expressió de LC3BI/II, la detecció dels autofagolisosomes per citometria de flux i microscòpia de fluorescència, i silenciament gènic amb siRNA.

Resultats: Everolimus exercia un efecte antitumoral en les cèl·lules de MCL mentre que preservava les cèl·lules normals. En línies cel·lulars, aquest fenomen estava associat a una parada del cicle cel·lular en fase G₁, desfosforilació dels substrats de mTOR, 4EBP1 i S6RP, i refosforilació d'AKT. Es va observar un efecte citotòxic sinèrgic entre everolimus i un inhibidor d'AKT, que va contrarestar la reactivació compensatòria de la via de senyalització de mTOR. Les cèl·lules de MCL amb una baixa resposta a la combinació van mostrar elevats nivells d'autofàgia. En conseqüència, el silenciament triple dels gens d'autofàgia *ATG3*, *ATG5* i *ATG7* i el pretractament amb l'inhibidor de l'autofàgia hidroxiclороquina, van superar la resistència als inhibidors d'AKT/mTOR, conduint a l'activació de la via apoptòtica mitocondrial.

Conclusions: Aquests resultats suggereixen que la inducció de l'autofàgia protegeix les cèl·lules de MCL de la inhibició d'AKT/mTOR i que contrarestar l'autofàgia pot representar una bona estratègia terapèutica per sensibilitzar les cèl·lules de MCL a la teràpia basada en everolimus.

Counteracting Autophagy Overcomes Resistance to Everolimus in Mantle Cell Lymphoma

Laia Rosich, Silvia Xargay-Torrent, Mónica López-Guerra, et al.

Clin Cancer Res 2012;18:5278-5289. Published OnlineFirst August 9, 2012.

Updated version Access the most recent version of this article at:
[doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-0351](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0351)

Supplementary Material Access the most recent supplemental material at:
<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/suppl/2012/08/09/1078-0432.CCR-12-0351.DC1.html>

Cited Articles This article cites by 42 articles, 18 of which you can access for free at:
<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/18/19/5278.full.html#ref-list-1>

Citing articles This article has been cited by 2 HighWire-hosted articles. Access the articles at:
<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/18/19/5278.full.html#related-urls>

E-mail alerts [Sign up to receive free email-alerts](#) related to this article or journal.

Reprints and Subscriptions To order reprints of this article or to subscribe to the journal, contact the AACR Publications Department at pubs@aacr.org.

Permissions To request permission to re-use all or part of this article, contact the AACR Publications Department at permissions@aacr.org.

Counteracting Autophagy Overcomes Resistance to Everolimus in Mantle Cell Lymphoma

Laija Rosich, Sílvia Xargay-Torrent, Mónica López-Guerra, Elías Campo, Dolors Colomer, and Gaël Roué

Abstract

Purpose: Mantle cell lymphoma (MCL) is an aggressive B-lymphoid neoplasm with poor response to conventional chemotherapy and short survival. The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR survival pathway is constitutively activated in MCL cells, thereby making the mTOR inhibition an attractive therapeutic strategy. The first clinical studies of everolimus (RAD001), an mTOR inhibitor, in relapsed MCL patients have reported a significant response. Our aim was to analyze the mechanism related to everolimus resistance/sensitivity in MCL cells.

Experimental Design: Sensitivity to everolimus was analyzed in MCL cell lines and primary MCL cells. Everolimus mechanism of action was determined by flow cytometry and Western blot. Particularly, autophagy was studied by LC3BI/II expression, autophagolysosomes detection by flow cytometry and fluorescence microscopy, and siRNA-mediated gene silencing.

Results: Everolimus exerted antitumoral effect on MCL cells while sparing normal cells. In MCL cell lines, this phenomenon was associated to G₁ cell-cycle arrest, dephosphorylation of the mTOR downstream targets, 4E-BP1 and S6RP, and rephosphorylation of Akt. A synergistic cytotoxic effect was observed between everolimus and an Akt inhibitor, which overcame the compensatory reactivation within the mTOR signaling pathway. Interestingly, MCL cells with low response to this combination showed high levels of autophagy. Accordingly, selective triple knockdown of the autophagy genes *ATG7*, *ATG5* and *ATG3*, and pretreatment with the autophagy inhibitor hydroxychloroquine, efficiently overcame the resistance to Akt/mTOR inhibitors, leading to the activation of the mitochondrial apoptotic pathway.

Conclusions: These results suggest that autophagy induction protects MCL cells from Akt/mTOR targeting and counteracting autophagy may represent an attractive strategy for sensitizing MCL cells to everolimus-based therapy. *Clin Cancer Res*; 18(19); 5278–89. ©2012 AACR.

Introduction

Mantle cell lymphoma (MCL) is an aggressive lymphoid neoplasm that accounts for 5% to 10% of all B-cell non-Hodgkin's lymphomas. It is genetically characterized by the chromosomal translocation t(11;14)(q13;q32) resulting in overexpression of cyclin D1. Moreover, high levels of chromosomal instability related to the disruption of the DNA damage response pathway and activation of cell survival mechanisms may confer an aggressive clinical course to the disease (1). Standard chemotherapy approaches are fre-

quently used, but long-term remissions are rare. After failure of first- or second-line treatments, various single agents are used despite limited response rates (2). Thus, there is still a strong unmet medical need for new treatment options in MCL.

The constitutive activation of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and the serine/threonine kinases Akt and mTOR are known to confer drug resistance to many types of cancer, including MCL (2). Thus, this pathway has emerged as a promising therapeutic target. mTOR is an evolutionarily conserved kinase that integrates signals from growth factors, nutrients, and stresses to regulate multiple processes, including mRNA translation, cell-cycle progression, autophagy, and cell survival. mTOR resides in 2 distinct multi-protein complexes referred to as mTOR complex 1 (mTORC1) and mTOR complex 2 (mTORC2). By phosphorylating S6 kinase 1 and the eIF4E-binding protein 1 (4E-BP1), mTORC1 controls the translation of key regulatory proteins involved in cell proliferation (3). mTORC2 modulates cell survival in response to growth factors by phosphorylation of its downstream effectors Akt and serum/glucocorticoid regulated kinase 1 (4). In addition to directly activate Akt as part of mTORC2, mTOR, as part of

Authors' Affiliation: Hematopathology Unit, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

Note: Supplementary data for this article are available at Clinical Cancer Research Online (<http://clincancerres.aacrjournals.org/>).

D. Colomer and G. Roué share the senior authorship of this article.

Corresponding Author: Gaël Roué, IDIBAPS, Hemato-oncology Department, Rosselló, 153, 08036 Barcelona, Spain. Phone: 34-932-275-400, ext 4525; Fax: 34-933-129-407; E-mail: groue@clinic.ub.es

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0351

©2012 American Association for Cancer Research.

Translational Relevance

Mantle cell lymphoma (MCL) is an aggressive neoplasm that lacks effective therapy. The mTOR kinase inhibitor everolimus (RAD001) has shown activity in preclinical and clinical models of MCL, although its mechanism of action has not been fully elucidated. Here, we find that everolimus activity in MCL cell lines and primary cultures is closely linked to Akt phosphorylation status, and that the prevention of Akt rephosphorylation upon everolimus treatment by means of a selective Akt inhibitor greatly enhances everolimus activity in MCL cells. Furthermore, our data reported here show that an accumulation of autophagic vacuoles may limit the efficacy of dual Akt/mTOR targeting in resistant cells, and that secondary inhibition of autophagosome formation completes the therapeutic potential of this strategy. We thus provide the proof of principle and rationale for further clinical evaluation of Akt/mTOR and autophagy triple targeting to improve patient outcome in MCL.

mTORC1, also negatively regulates Akt by suppressing growth factor-driven pathways (5).

The macrocyclic lactone antibiotic rapamycin (sirolimus), an allosteric mTORC1 inhibitor isolated from *Streptomyces hygroscopicus*, was found to possess immunosuppressive and antiproliferative properties. More recently, 3 rapamycin derivatives (termed rapalogs)—temsirolimus (CCI-779), ridaforolimus (AP23573, MK-8669), and everolimus (RAD001)—with improved properties were developed (6). Temsirolimus was approved by the European Medicines Agency for the treatment of relapsed and refractory MCL, while ridaforolimus and everolimus have been studied in various clinical trials (7). These rapalogs have reported a moderate success as monotherapy with mild toxic effects, with an observed half-life of about 30 hours (8, 9). A recent phase II study of everolimus reported a 32% overall response rate in MCL patients (10), which is similar to that found in other trials using temsirolimus (11–13). However, the effectiveness of these agents as single agent therapies is stifled in part by strong mTORC1-dependent negative feedback loops that become inactive on mTORC1 inhibition, paradoxically leading to survival promoting events such as the activation of Akt (5, 14). Thus, these compounds may represent good candidates in combination with chemotherapy and targeted agents capable of counteracting these mechanisms of resistance (15).

In this context, our purpose was to describe the molecular bases of MCL cell response to everolimus, with the aim to validate new possible combination strategies. Herein, we show that everolimus induces the rephosphorylation of Akt, mediated by a feedback loop within the PI3K/Akt/mTOR axis that can be blocked by the Akt inhibitor VIII isozyme-selective Akti-1/2. We also show the protective effect of

autophagy to actively counteract everolimus and Akti-1/2 activity in MCL cell lines and primary samples. Thus, we propose the triple targeting of mTOR, Akt, and autophagy as a requisite for effective antitumoral therapy in MCL.

Materials and Methods

Cell lines

The MCL cell lines REC-1, JEKO-1, GRANTA-519, UPN-1, HBL-2, JVM-2, MAVER-1, and Z-138 (Table 1) used in this study were cultured in RPMI 1640 or Dulbecco's Modified Eagle's Medium, supplemented with 10% to 20% heat-inactivated FBS, 2 mmol/L glutamine and 50 µg/mL penicillin-streptomycin (Life Technologies). All cultures were routinely tested for *Mycoplasma* contamination by PCR and the identity of all cell lines was verified by using AmpFISTR identifier kit (Life Technologies).

Isolation and culture of primary cells

Cells from 11 patients diagnosed with MCL according to the World Health Organization classification criteria (16), who had not received treatment for the 3 previous months, were used. The clinical characteristics of these patients are listed in Table 1. Informed consent was obtained from each patient in accordance with the guidelines of the Ethical Committee of the Hospital Clinic in Barcelona, Spain, and the Declaration of Helsinki. For all samples, cyclin D1 overexpression was determined by immunohistochemistry or real-time PCR. *P53* mutational status was assessed by FISH and direct sequencing. Mononuclear cells from peripheral blood samples (PBMNC) were isolated by Ficoll/hypaque sedimentation (GE Healthcare), and conserved within the Hematopathology Biobank of our institution (CDB Biobank/IDIBAPS-Hospital Clínic Biobank). Cells were either used directly or cryopreserved in liquid nitrogen in the presence of 10% dimethyl sulfoxide, 60% FBS, and 30% RPMI 1640. Freezing/thawing manipulations did not influence cell response (17).

Treatments and assessment of apoptosis by flow cytometry

Cells received as indicated a single treatment of everolimus (kindly provided by Novartis), Akt inhibitor VIII isozyme-selective Akti-1/2 (Calbiochem), hydroxychloroquine sulfate (Sigma), bafilomycin A1 (Sigma), and tamoxifen (Enzo Life Sciences). Cell viability was quantified by staining of external exposure of phosphatidylserine (PS) residues with Annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC) and propidium iodide (PI; Bender Medsystems). For the analysis of apoptosis in CD3⁺ and CD19⁺ subpopulations, PBMNCs were labeled simultaneously with anti-CD3-FITC, anti-CD19-Phycoerythrin (PE; Becton Dickinson) antibodies, and Annexin V-allophycocyanin (APC; Bender Medsystems). Changes in mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\psi_m$) and reactive oxygen species (ROS) production were evaluated by staining cells with 20 nmol/L 3,3'-diethyloxycarbocyanine iodide (DiOC₆[3]; Life Technologies) and 2 µmol/L dihydroethidine (DHE; Life Technologies), respectively. For the quantification of caspase-3/

Table 1. Characteristics of MCL cell lines and primary samples

MCL cell line	% cytostatic effect 24 h, 5 μ mol/L	% cytostatic effect 72 h, 5 μ mol/L	GI ₅₀ 72 h, nmol/L	% cytotoxicity 72 h, 5 μ mol/L	Genetic alterations		
					P53 ^a	ATM	P16
Z-138	16.82	16.88	NR	6.08	wt	del/ ^b	del
MAVER-1	18.85	31.89	NR	5.12	del/mut	del/ ^b	del
JVM-2	16.09	34.41	NR	4.71	wt	wt	wt
HBL-2	8	45.10	NR	1.23	del/mut	upd	del
UPN-1	22.28	62.73	125.7	4.25	del/mut	wt	del/ ^b
GRANTA-519	19.94	63.30	62.88	10.54	del/wt	del/mut	del
JEKO-1	21.16	68.52	25.5	8.61	del/mut	ampl/ ^b	del/ ^b
REC-1	23.38	69.38	4.35	10.69	wt	wt/ ^b	del

Patient no.	LD ₅₀ 48 h, μ mol/L	% cytotoxicity 48 h, 5 μ mol/L	Disease status	Morphologic variant	% of tumor cells ^c	P53 ^a status
1	NR	8.64	Diagnosis	Classical	77	wt
2	NR	10.4	Diagnosis	Blastoid	94	wt
3	NR	20.2	Diagnosis	Classical	97	wt
4	NR	25.4	Diagnosis	Classical	85	wt
5	NR	28.9	Diagnosis	Classical	79	del/wt
6	NR	31.2	Diagnosis	Classical	96	del/wt
7	3.89	38.7	Diagnosis	Classical	89	wt
8	3.81	63.2	Diagnosis	Blastoid	80	wt
9	3.62	67.6	Diagnosis	Classical	83	wt
10	3.84	69.6	Diagnosis	Classical	86	wt
11	4.03	73.5	Diagnosis	Classical	91	del/mut

Abbreviations: NR, not reached; wt, wild type; del, deletion; mut, mutation; ampl, amplification; upd, uniparental disomy.
^aP53 mutational status assessed by FISH and direct sequencing.
^bMutations not analyzed.
^cCD19⁺ tumor cells quantified by flow cytometry.

7 activity, cells were labeled with 2 μ mol/L CellEvent caspase-3/7 green detection reagent (Life Technologies) for 30 minutes at 37°C. A total of 10,000 stained cells per sample were acquired and analyzed in a FACScan or FACS-Calibur flow cytometer by using Cellquest and Paint-A-Gate softwares (Becton Dickinson). Lethal dose 50 (LD₅₀) was defined as the concentration of drug required to reduce cell viability by 50%. In drug combination studies, combination index (CI) values were calculated according to the Chou–Talalay method by means of the Calcsyn software version 2.0 (Biosoft), where CI < 1 indicated synergistic effect between 2 drugs.

Cell proliferation assay

MCL cell lines (5×10^4) were incubated for 72 hours with everolimus. MTT [3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] reagent (Sigma) was added for 2 to 5 additional hours before spectrophotometric measurement. Each measurement was made in triplicate, and the mean value was calculated. For each cell line, values were represented using untreated control cells as a reference. The growth inhibitory activity 50 (GI₅₀) was calculated as the dose that produced 50% growth inhibition.

Cell-cycle analysis

Cells were incubated for 72 hours with everolimus, washed in PBS and fixed with 70% ethanol. After incubation with PI for 30 minutes at 37°C, cell-cycle fractions were determined by flow cytometry (FACScan). The analysis was conducted by applying the ModFit LT software (Verity Software House).

Western blot analysis

Whole-cell protein extracts were obtained by lysing cells in Triton buffer (20 mmol/L Tris-HCl pH 7.6, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, and 1% Triton X-100) supplemented with protease and phosphatase inhibitors (10 μ g/mL leupeptin, 10 μ g/mL aprotinin, 1 mmol/L phenylmethanesulfonyl fluoride, 5 mmol/L NaF, and 2 mmol/L Na₃VO₄). Solubilized proteins were quantified by Bradford protein assay and 50 μ g of cell lysates were loaded onto 12% to 15% SDS-PAGE and transferred to an Immobilon-P membrane (Millipore). Membranes were blocked in TBS-Tween 20 containing 5% phosphoBlocker Blocking Reagent (Cell Biolabs) and probed with antibodies against: phospho-mTOR (Ser2448), phospho-Akt (Ser473), phospho-S6 ribosomal protein (S6RP; Ser235/236), phospho-4E-BP1

(Thr37/46), mTOR, Akt, S6RP, 4E-BP1, cleaved caspase-3 (Asp175, clone 5A1E), LC3B, ATG5 (D1G9) and ATG3 (Cell Signaling Technology), PARP (Roche), and ATG7 (clone EP1759Y; Abcam). Membranes were then incubated with horseradish peroxidase-labeled anti-mouse or anti-rabbit (Sigma and Cell Signaling Technologies) secondary antibodies. Chemiluminescence detection was done by using ECL system (Pierce) in a mini-LAS4000 Fujifilm device, and relative protein quantification of LC3B was conducted with Image Gauge software (Fujifilm). Equal protein loading was confirmed by analyzing α -tubulin expression (Sigma).

Autophagolysosome detection

Samples containing 5×10^5 to 1×10^6 cells were stained for autophagolysosome contents with Cyto-ID Green Detection Reagent (Enzo Life Sciences) as described (18) for 30 minutes at 37°C, and the intensity of the green fluorescence was measured by flow cytometry (FACScan). Results were represented as histogram overlays. Hoechst 33342 Nuclear Stain was added to the Cyto-ID Green Detection Reagent stained cell suspension and applied to a glass microscope slide, covered with a cover slip and visualized on a Olympus BX41 microscopy ($\times 40$ objective) with the use of Cell α ID Imagine Software (Olympus).

RNA interference assay

Z-138 cells (5×10^6) were cultured for 24 hours without antibiotics and washed with FBS-free RPMI medium. Cells were then electroporated with a Nucleofector II device (Lonza) in 100 μ L of Ingenio Electroporation Solution (Mirus) containing 10 μ mol/L of a mix of 6 different Silencer Select Predesigned siRNAs targeting ATG7, ATG5, and ATG3, and a nonsilencing negative control (Ambion). C-005 Nucleofector program was used. After transfection, cells were transferred to culture plates for 6 hours before experiments were set up.

Statistical analysis

Data are represented as mean \pm SD or SEM of 3 independent experiments. Statistical analysis was conducted with the use of GraphPad Prism 4.0 software (GraphPad Software). Two-way ANOVA was used to determine how response is affected by 2 factors. Results were considered statistically significant when P value < 0.05 (*, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$).

Results

Everolimus exerts selective antitumoral effect in MCL cells

To explore the antitumoral effect of everolimus, a panel of 8 MCL cell lines and 11 MCL primary samples were exposed for 48 hours (primary cells) or 72 hours (cell lines) to increasing doses of the drug (0.05, 0.5, and 5 μ mol/L). Apoptosis induction and drug cytostatic effect were determined simultaneously by flow cytometry and MTT proliferation assay, respectively. As shown on Fig. 1A, everolimus

mainly induced a cytostatic effect in MCL cell lines in a dose-dependent manner with minor ($< 11\%$) cytotoxic activity (Table 1). In the high-sensitive MCL cell lines (UPN-1, GRANTA-519, JEKO-1, and REC-1), most of this effect ($>50\%$ antiproliferative activity) was reached at the lowest dose tested (0.05 μ mol/L), with a $GI_{50} < 130$ nmol/L. In contrast, the low-sensitive cell lines (Z-138, MAVER-1, JVM-2, and HBL-2) did not undergo a marked proliferation decrease after everolimus treatment at doses below 5 μ mol/L. In these cell lines, the GI_{50} at 72 hours could not be reached (Table 1). Consistently, cell-cycle analysis of 3 representative cell lines revealed a blockade in G_0 - G_1 phase in the sensitive cells REC-1 and GRANTA-519, whereas the low sensitive Z-138 cells showed only a slight increase in the S phase cell fraction (Fig. 1B).

MCL primary cells showed a high sensitivity to the compound as a cytotoxic effect was detected in the majority of the samples as soon as 48 hours of treatment, contrasting with the low cell death rates observed in the cell lines, even after a 72-hour exposure to everolimus (Fig. 1C and Table 1). Five cases (MCL no. 7, 8, 9, 10, and 11) were sensitive to everolimus, with a mean LD_{50} of 3.84 ± 0.15 μ mol/L, whereas 6 cases (MCL no. 1, 2, 3, 4, 5, and 6) showed a lower response to the drug ($LD_{50} > 5$ μ mol/L; Table 1). This cytotoxic effect was shown to be selective as neither normal B (CD19⁺) nor normal T lymphocytes (CD3⁺) from healthy donors were notably affected by 5 μ mol/L everolimus (Fig. 1C).

Of note, there was no association between MCL sensitivity to everolimus and common cytogenetic alterations such as deletions of *P53*, *ATM*, or *P16*, either in MCL cell lines or primary cells (Table 1).

Thus, these results show that everolimus induces apoptosis in the majority of MCL primary samples, at physiologically achievable doses, sparing normal B and T cells.

Everolimus modulates mTOR signaling pathway in MCL cells

To ensure that everolimus activity in MCL cell lines and primary MCL cells was linked to mTOR pathway inhibition, REC-1, GRANTA-519, Z-138 cells, and a representative MCL primary sample were treated with everolimus (doses ranging from 0.05 to 5 μ mol/L) for up to 72 hours. Fig. 2A and B shows that short time incubation (24 hours) with everolimus in REC-1 and GRANTA-519 cells caused a dose-dependent decrease in the phosphorylation levels of Akt, mTOR, and its downstream targets, S6RP and 4E-BP1. About 4E-BP1, while the hyperphosphorylated isoforms decreased, the hypophosphorylated form accumulated after everolimus treatment. Interestingly, part of these effects was not sustained and after prolonged exposure to everolimus (48–72 hours), we observed a rephosphorylation of Akt and mTOR. In contrast, in the low-sensitive Z-138 cell line, everolimus only induced a transient downregulation of p-S6RP and p-4E-BP1 proteins, with no substantial changes in the levels of phospho-mTOR and a slight decrease in Akt phosphorylation at the higher dose and time of exposure (Fig. 2C). Importantly, everolimus efficiently inhibited

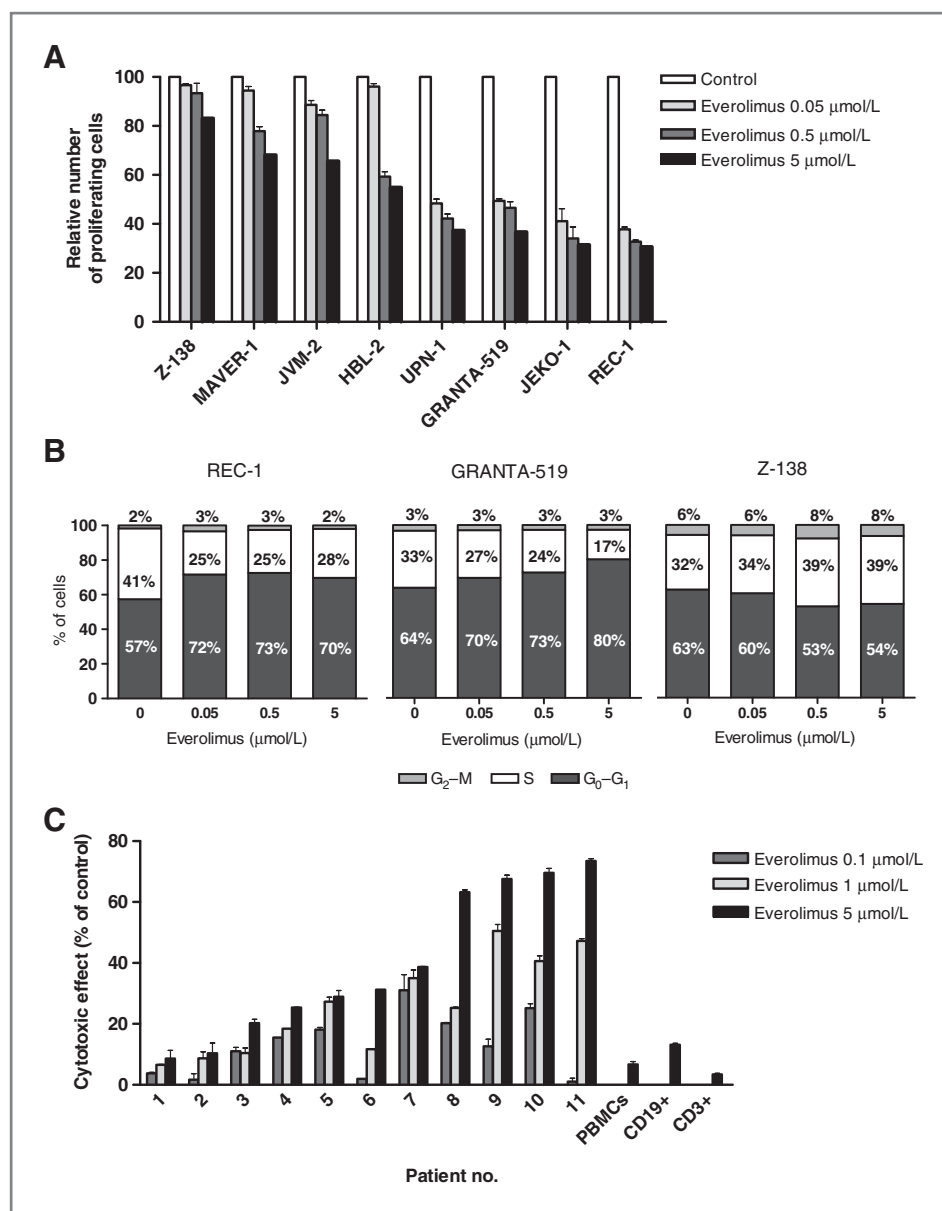


Figure 1. Everolimus antiproliferative effect in mantle cell lymphoma (MCL) cells. **A**, MCL cell lines were incubated for 72 hours with increasing doses of everolimus (0.05–5 $\mu\text{mol/L}$) before drug cytostatic effect was analyzed by MTT proliferation assay. **B**, REC-1, GRANTA-519, and Z-138 cells were treated for 72 hours with everolimus (0.05–5 $\mu\text{mol/L}$) and cell-cycle fractions were determined by flow cytometry of propidium iodide-labeled nuclei. **C**, MCL primary cells and peripheral blood mononuclear cells from healthy donors were incubated with everolimus (0.1, 1, and 5 $\mu\text{mol/L}$) and cytotoxicity was assessed by cytofluorimetric analysis of Annexin V labeling at 48 hours as described in Materials and Methods.

mTOR activity in a representative sensitive MCL primary sample (Fig. 2D), as established by lower levels of phosphorylated mTOR, Akt, S6RP, and 4E-BP1, without observing compensatory reactivation of Akt after 48 hours of incubation.

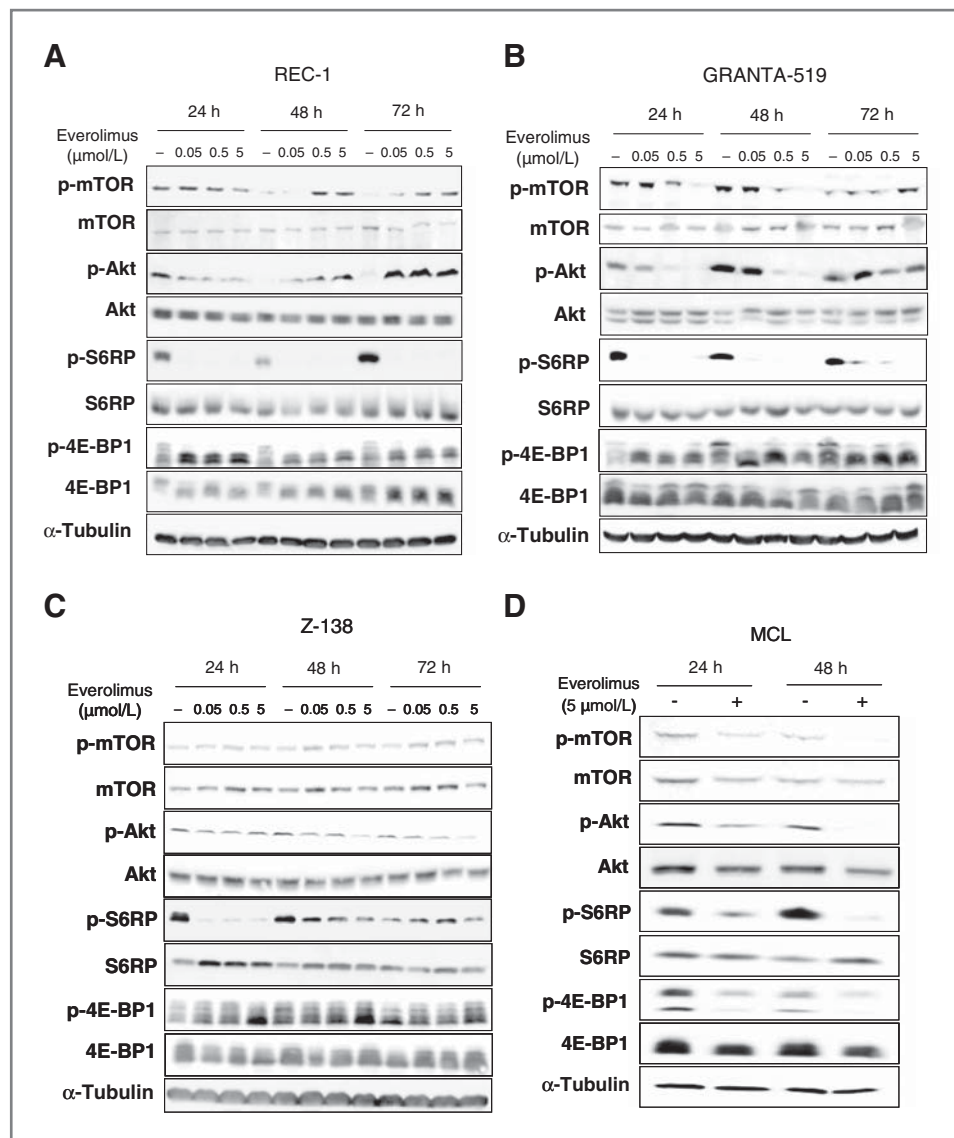
Altogether, these data indicate that although everolimus inhibits mTOR pathway at short time treatment, Akt rephosphorylation after prolonged exposure could limit its efficacy, consistent with the existence of feedback loops within the mTOR signaling pathway, as described previously (14, 19).

Akt targeting increases everolimus activity in MCL cells

To investigate the impact of the Akt rephosphorylation in MCL cells exposed to everolimus, REC-1, GRANTA-519,

and Z-138 cell lines were pretreated with or without 2 or 5 $\mu\text{mol/L}$ of the Akt inhibitor Akti-1/2 for 3 hours and incubated with everolimus at 0.5 and 5 $\mu\text{mol/L}$ for 24 additional hours. As shown on Fig. 3A, MCL cell viability was almost unaffected by Akti-1/2, whereas its addition to everolimus allowed to reduce cell viability more efficiently than single drug treatment. We found the combination of everolimus 5 $\mu\text{mol/L}$ with Akti-1/2 5 $\mu\text{mol/L}$ to be synergistic in REC-1 and GRANTA-519 cells, with respective CI values of 0.691 and 0.602. In contrast, this combination failed to induce cytotoxicity in the everolimus-low sensitive cell line Z-138 (Fig. 3A), although it allowed a synergistic cytostatic effect, as monitored by MTT assay (Supplementary Fig. S1). Of note, the combination of both agents was synergistic in all the MCL primary cells tested ($n = 8$),

Figure 2. Modulation of mTOR pathway in mantle cell lymphoma (MCL) cells exposed to everolimus. REC-1 (A), GRANTA-519 (B), Z-138 (C), and a representative MCL primary sample (patient no. 11; D) were incubated with everolimus at the indicated doses and times. The levels of phosphorylated and total mTOR pathway proteins (mTOR, Akt, S6RP, and 4E-BP1) were determined by Western blot. The different isoforms of 4E-BP1 represent the phosphorylation status of the protein, with the highest and the lowest bands corresponding to the hyperphosphorylated and the hypophosphorylated forms, respectively. α -tubulin was probed as an equal loading control.



although a significant increase ($P < 0.001$) in cell death induction was only observed in the subset of MCL cases sensitive to everolimus single agent, with a mean CI value of 0.229 (Fig. 3B).

In an attempt to analyze the mechanisms underlying the combinatory effect of Akti-1/2 and everolimus, both REC-1 and Z-138 cells were treated for 24 and 48 hours with everolimus and/or Akti-1/2, followed by Western blot of Akt/mTOR pathway status. Figure 3C shows that Akti-1/2 efficiently blocked Akt phosphorylation in both cell lines, including when added to everolimus. This effect, combined with everolimus inhibitor activity against the mTOR targets p-S6RP and p-4E-BP1, led to the activating processing of the effector caspase-3 and degradation of the caspase substrate PARP in REC-1, but not in Z-138 cells, indicating a defect in apoptosis induction after Akt inhibition in Z-138 cells (Fig. 3C).

These results show a synergistic interaction between everolimus and the Akt inhibitor Akti-1/2 in MCL cells, suggesting a role for Akt signaling in MCL resistance to mTOR targeting.

Everolimus/Akti-1/2 low-responsive MCL cells have increased levels of autophagy

The Akt/mTOR pathway has been implicated in the regulation of autophagy in several models of cancer (20, 21). To explain the heterogeneous efficacy of everolimus/Akti-1/2 combination in MCL cells, we assessed the degree of autophagy induction in Z-138 and REC-1 cells. Western blot analysis of the autophagy-initiating protein LC3B showed that everolimus/Akti-1/2 treatment led to the processing of LC3B-I to LC3B-II, indicative of an increase in the autophagic activity (Fig. 4A). Importantly, this phenomenon was mainly observed in the everolimus/Akti-1/2

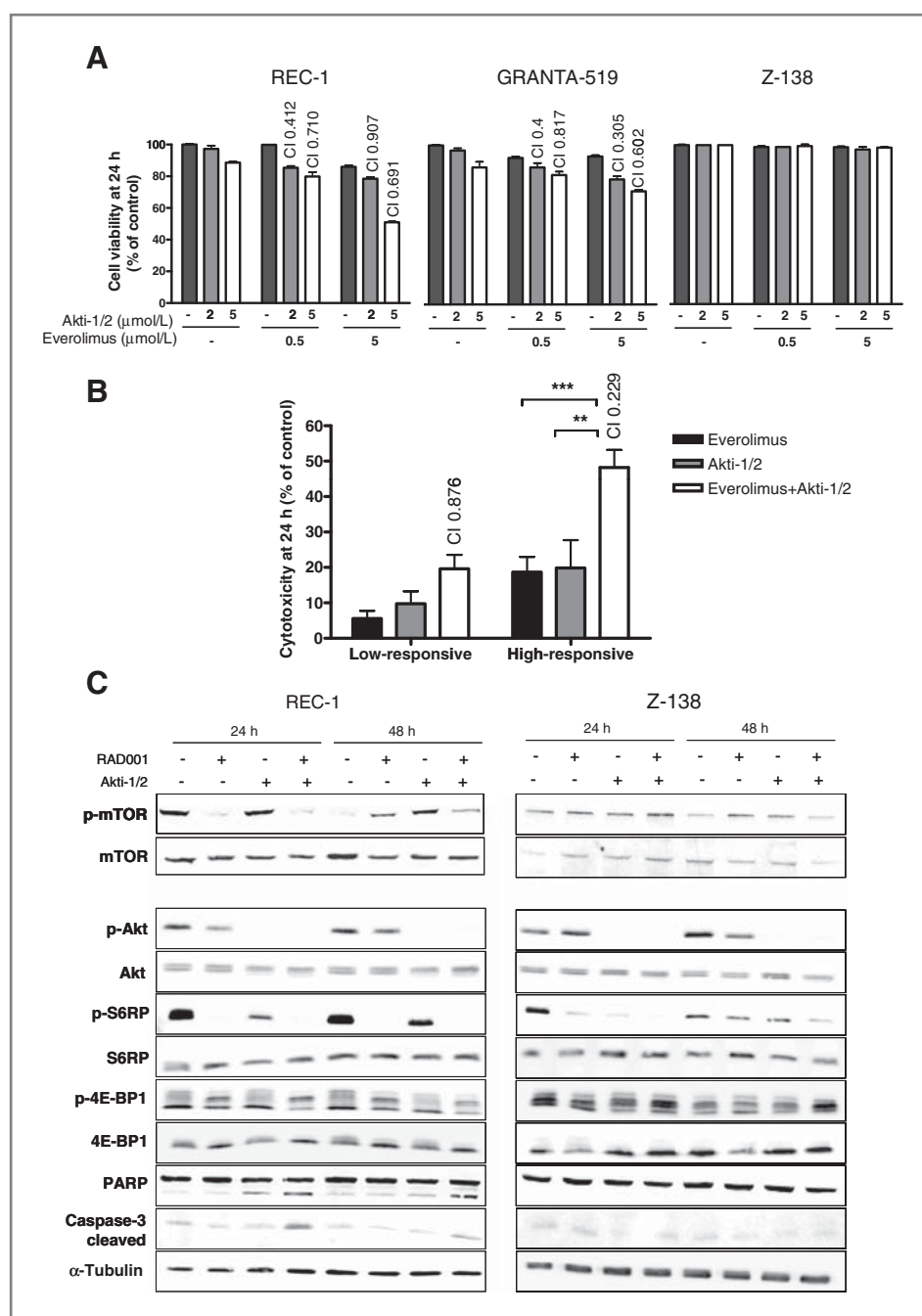


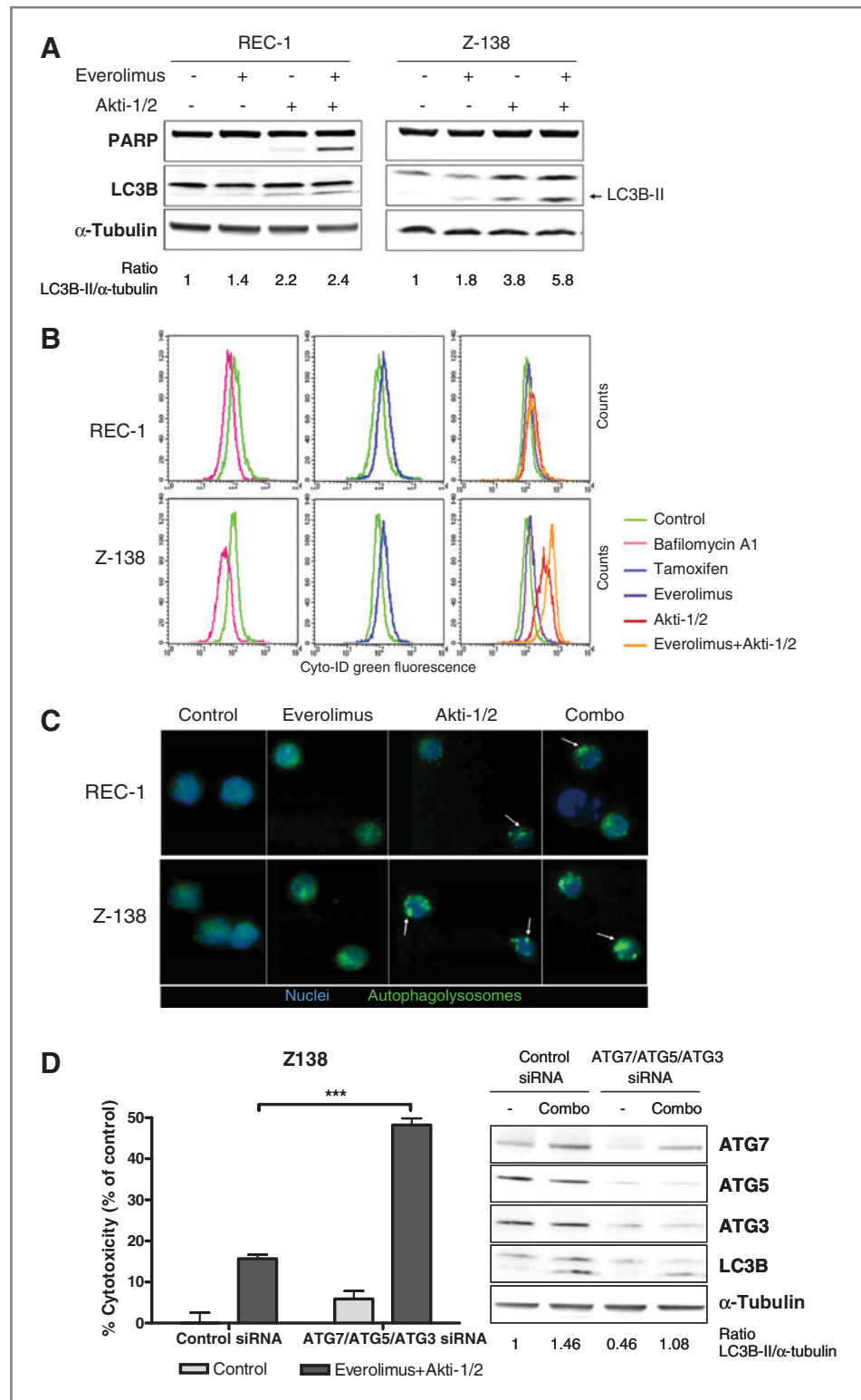
Figure 3. Synergistic effect of everolimus and the Akt inhibitor Akti-1/2. **A**, REC-1, GRANTA-519, and Z-138 cells were pretreated with Akti-1/2 for 3 hours and incubated with everolimus for 24 hours at the indicated doses. Cell viability was analyzed by flow cytometry labeling of AnnexinV/PI. Combination index (CI) value is indicated for each combination. **B**, primary MCL cells were pretreated for 3 hours with 5 μmol/L Akti-1/2, followed by an additional 24-hour exposure to 5 μmol/L everolimus. Bars represent the mean ± SEM of cell death referred to untreated control for everolimus low-responsive ($n = 4$) and high-responsive ($n = 4$) cells. Statistical significance was assessed by 2-way ANOVA test (**, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$). CI value is indicated for each combination. **C**, REC-1 and Z-138 cells were preincubated with 5 μmol/L Akti-1/2 for 3 hours and treated with 5 μmol/L everolimus for 24 or 48 hours before Western blot analysis. α-tubulin was probed as an equal loading control.

low-responsive Z-138 cells (ratio LC3B-II/α-tubulin of 5.8), compared with the sensitive cells REC-1 (ratio LC3B-II/α-tubulin of 2.4). As LC3B-II is known to specifically associate with the autophagosome membrane, we then studied the production of autophagic vacuoles in REC-1 and Z-138 cells. Both cell lines were pretreated with Akti-1/2 (5 μmol/L, 3 hours) and incubated with everolimus. After 24 hours of treatment, cells were stained with the autophagy Cyto-ID Green dye, and then analyzed by flow cytometry. Tamoxifen (22) and bafilomycin A1-treated cells (23, 24) were used as a positive and negative control for autophagy

golysosome detection, respectively (Fig. 4B). In REC-1 cells, everolimus/Akti-1/2 treatment provoked a slight green fluorescence increase, indicative of some levels of autophagy induction. In contrast, in Z-138 cells, everolimus and Akti-1/2 alone, but especially the combination of both drugs, caused a 5-fold increase in mean fluorescence intensity, revealing an enhanced autophagolysosome formation by dual Akt/mTOR targeting.

To provide further evidence of the autophagy stimulation after everolimus/Akti-1/2 treatment, we studied the accumulation of Cyto-ID Green stained autophagolysosomes

Figure 4. Increased levels of autophagy in everolimus/Akti-1/2 low-responsive cells. **A**, PARP and LC3B expression were analyzed by Western blot in REC-1 and Z-138 cells after a 3-hour preincubation with 5 $\mu\text{mol/L}$ Akti-1/2, followed by a 24-hour treatment with 5 $\mu\text{mol/L}$ everolimus. α -tubulin was probed as an equal loading control. Ratio between α -tubulin and LC3B-II levels was calculated and relative protein quantification in treated versus control extracts was conducted with Image Gauge software (Fujifilm). **B** and **C**, autophagy was determined by detection of Cyto-ID Green stained autophagolysosomes by flow cytometry or fluorescence microscopy in REC-1 and Z-138 cells treated as above with everolimus, Akti-1/2, or both agents (combo). A 24-hour treatment with bafilomycin A1 (5 nmol/L for REC-1 and 50 nmol/L for Z-138 cells) or tamoxifen (24 hours, 10 $\mu\text{mol/L}$) was used as negative and positive controls of autophagy, respectively. High fluorescence intensity punctuate pattern corresponds to the production of autophagolysosomes (arrows). **D**, Z-138 cells were transfected by electroporation with ATG7/ATG5/ATG3 siRNA mix and nonsilencing siRNA. Transfected cells were then preincubated with 5 $\mu\text{mol/L}$ Akti-1/2 for 3 hours previously to everolimus treatment for 20 additional hours. Viability was assessed by flow cytometry labeling of AnnexinV/PI and knockdown of ATG proteins, as well as LC3B processing, were checked by Western blot. α -tubulin was probed as a loading control. LC3B-II/ α -tubulin ratio was calculated as previously. Statistical significance was assessed by 2-way ANOVA test (***, $P < 0.001$).



by fluorescence microscopy (Fig. 4C). Untreated control cells harbored a diffuse distribution of green fluorescence throughout the cytoplasm, whereas treated cells presented punctuate structures corresponding to the autophagic

vacuoles. As shown in Fig. 4C, we observed a substantial autophagy induction after Akti-1/2 treatment in both REC-1 and Z-138 cells (arrows), but the addition of everolimus notably increased the autophagic flux (arrows). Consistently,

this effect was more pronounced in the everolimus/Akti-1/2 low-responsive Z-138 cells than in the sensitive cells REC-1.

To ascertain if this increase in autophagy could promote MCL cell survival and drug resistance, we used a siRNA-mediated approach to simultaneously knockdown the ubiquitin-like activating enzyme homolog ATG7, the ubiquitin folds-containing protein ATG5, and the ubiquitin-conjugating enzyme analog ATG3, all involved in LC3 activation. ATG7/ATG5/ATG3 triple silencing reduced the basal protein levels of these 3 factors, thereby decreasing LC3B-II expression and significantly enhancing cell death after everolimus/Akti-1/2 treatment in Z-138 cell line ($P < 0.001$, Fig. 4D). A sensitizing effect, albeit reduced, was also observed in REC-1 cells (data not shown), emphasizing the role of autophagy in Z-138 resistance to everolimus/Akti-1/2 combination.

These findings highlight the contribution of autophagy to the resistance to everolimus/Akti-1/2 treatment in MCL cells.

Inhibition of autophagic vacuoles sensitizes MCL cells to everolimus/Akti-induced apoptosis

In an attempt to counteract the protective effect of autophagy toward everolimus/Akti-1/2 treatment, we assessed the effect of adding an autophagy inhibitor to increase the antitumoral effect of the combination. We used hydroxychloroquine, an antimalarial drug that blocks lysosome acidification and degradation of autophagosomes, causing an accumulation of autophagic vacuoles (25). REC-1 and Z-138 cells were preincubated with hydroxychloroquine 10 $\mu\text{mol/L}$ for 1 hour, then pretreated with 5 $\mu\text{mol/L}$ Akti-1/2 for 3 hours and finally incubated with 5 $\mu\text{mol/L}$ everolimus for 24 hours. Although this triple combination led to a significant induction of apoptosis in both MCL cell lines, this effect was highly significant ($P < 0.001$) in the everolimus/Akti-1/2 low sensitive Z-138 cells (Fig. 5A). As expected, hydroxychloroquine addition to the everolimus/Akti-1/2 treatment provoked an increase of LC3B-II expression in both cell lines (Fig. 5B). Moreover, the triple combination increased PARP cleavage in REC-1 cells and also in Z-138 cells, where the everolimus/Akti-1/2 treatment did not exert any cytotoxic effect (Fig. 5B). Similar results were obtained with baflomycin A1, another autophagy inhibitor (data not shown).

We then tested the effect of combining hydroxychloroquine with the Akt/mTOR inhibitors in MCL primary cases. Although hydroxychloroquine addition synergized with Akti-1/2 and everolimus in all MCL cases tested, only those cases with poor response to the everolimus/Akti-1/2 combination had a significant increase in cell death ($P < 0.01$; Fig. 5C).

Accordingly, while combination of everolimus and Akti-1/2 slightly activated the mitochondrial apoptotic pathway in low responsive MCL cells (Z-138 and a representative MCL primary sample), the addition of hydroxychloroquine enhanced the typical mitochondrial hallmarks of apoptosis, including mitochondrial depolarization, ROS production, caspase-3/7 activity, and PS exposure (Fig. 5D).

Taken together, these results show that the addition of an autophagy inhibitor overcomes the resistance of MCL cells to Akt/mTOR inhibitors, leading to efficient apoptosis induction and suggesting a prosurvival role of autophagy.

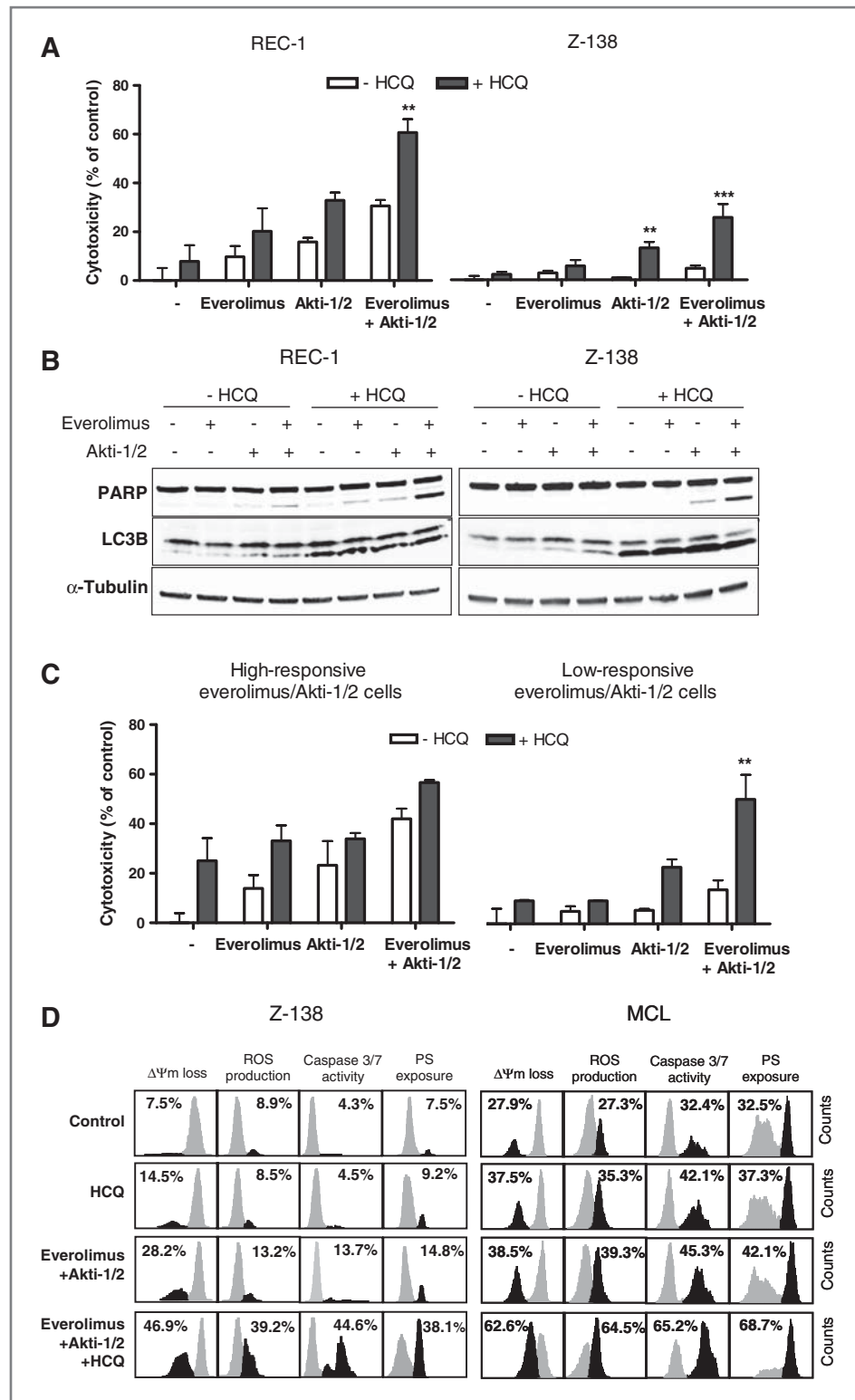
Discussion

The PI3K/Akt/mTOR axis is known to be constitutively activated in the majority of B-cell lymphomas. In these cancers, mTOR-activating events may include loss of PTEN function, leading to constitutive activation of Akt, constitutive or growth factor-induced stimulation of receptor tyrosine kinases, or overexpression of eIF4E (26). Specifically, in the blastoid variant of MCL, high levels of phosphorylation on Akt at Ser473 are frequently observed (27).

To target this pathway, several rapamycin analogs have shown activity against lymphoma cells both *in vitro* and *in vivo* (28). Here, using an extended panel of MCL cell lines, we confirm previous reports showing that the rapalog everolimus exerts an antiproliferative effect in MCL cell lines, mediated by cell-cycle blockade at G₁ phase (29). We also show for the first time that this agent induces a tumor-selective, dose-dependent cytotoxicity in the majority of primary MCL cases, in the range of doses achievable *in vivo*. As expected, we show that everolimus efficiently inhibits mTOR activity in sensitive cell lines and primary samples, as attested by a decrease in the phosphorylation levels of the mTOR downstream targets S6RP and 4E-BP1 at short-time treatment, and a transient dephosphorylation of Akt at Ser473. Importantly, we observe that prolonged mTORC1 inactivation leads to Akt rephosphorylation at this residue, a phenomenon described as a crucial determinant of malignant cell response to rapamycin-like drugs (14, 19). Suggesting that this late reactivation of Akt may counteract everolimus activity, we report that the combination of the rapalog to an isoselective Akt inhibitor exerts synergistic antitumoral activity in all the samples tested, especially in those cases with high sensitivity to everolimus single agent. In these cells, we show the effect of the combination to be mediated by activation of the intrinsic apoptotic program, whereas everolimus alone appears to be a weak apoptosis inducer, as previously reported for rapamycin (30).

Several evidences suggest that the synergism between Akt and mTOR dual targeting may rely on the blockade of the mTORC1-dependent response loop after mTOR inhibition, which has been shown to involve reactivation of upstream receptor kinase signaling within the IGFR pathway, as well as Akt itself, in both *in vitro* and *in vivo* models of human cancers (5, 31, 32). Emerging from this observation, the use of dual PI3K/mTOR inhibitors has shown to be useful not only to downregulate the mTOR targets 4E-BP1 or S6RP, but also to prevent Akt rephosphorylation at Ser473, independent of PI3K mutation status (33). In line with our results, the complete abolition of Akt/mTOR signaling by means of these dual inhibitors has been shown to exert increased cytostatic effect and to lead to apoptotic cell death in PI3K/Akt/mTOR-addicted lymphomas (34, 35), thus highlighting the requirement of a full inhibition of the pathway for

Figure 5. The autophagy inhibitor hydroxychloroquine overcomes the resistance to everolimus/Akti-1/2 inhibitors. **A**, REC-1 and Z-138 cells were pretreated with 50 $\mu\text{mol/L}$ hydroxychloroquine (HCQ) for 1 hour, followed by 3-hour incubation with 5 $\mu\text{mol/L}$ Akti-1/2 and exposure to 5 $\mu\text{mol/L}$ everolimus for 24 hours. Cytotoxicity was determined by flow cytometry labeling of AnnexinV/PI. Bars represent the mean \pm SEM of cell death referred to control cells. Statistical significance was assessed by 2-way ANOVA test (**, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$). **B**, REC-1 and Z-138 cells were treated as above for 24 hours. PARP and LC3B expression was analyzed by Western blot. α -tubulin was probed as an equal loading control. **C**, primary MCL samples from the high-responsive ($n = 3$) and the low-responsive ($n = 3$) everolimus/Akti-1/2 group were preincubated with 10 $\mu\text{mol/L}$ HCQ for 1 hour before treatment with 5 $\mu\text{mol/L}$ Akti-1/2 for 3 hours and an additional 24-hour exposure to 5 $\mu\text{mol/L}$ everolimus. Statistical significance was assessed by 2-way ANOVA test (**, $P < 0.01$; $n = 3$). **D**, Z-138 cells and a representative everolimus/Akti-1/2 low-responsive MCL sample were treated with HCQ (50 $\mu\text{mol/L}$ for Z-138, 10 $\mu\text{mol/L}$ for MCL primary cells), Akti-1/2, and everolimus as above for 48 hours and typical apoptosis hallmarks were determined by flow cytometry as described in Materials and Methods. Percentages inside each chart refer to the population in black.



improved antitumoral activity. However, we observed that those MCL samples that are weak responders to everolimus single agent still harbor a high viability rate despite the complete Akt/mTOR axis inhibition, similar to a previous

observation in follicular lymphoma (35). Among the resistance mechanisms that may account for this defective apoptosis initiation, accumulating evidences suggest that autophagy is one of the major process functionally involved

in cancer cell survival after Akt and mTOR inhibitor exposure (36).

Autophagy is an evolutionarily conserved intracellular self-defense mechanism, which serves to maintain cellular metabolism through recycling of cellular components when the availability of external nutrient sources is limited (36). Although constitutive autophagy is a homeostatic mechanism for metabolic regulation, it is also stress responsive, and through the removal of damaged proteins and organelles, it confers stress tolerance and sustains viability under adverse conditions (37). mTOR kinase inhibition has been shown to induce a prosurvival autophagy that can counteract the effect of common chemotherapeutics in colon carcinoma (38). In MCL cells, the rapalog temsirolimus has also been shown to activate autophagic processing, although the contribution of this phenomenon to the activity of the mTOR inhibitor was not clearly discussed (39). Our results show that 2 hallmarks of autophagy, LC3B processing and autophagic vacuoles formation, are enhanced in MCL cells resistant to everolimus/Akti-1/2 combination, when compared with sensitive cells. More important, we show that autophagy controls MCL response to mTOR/Akt inhibitors, as knockdown of ATG7, ATG5, and ATG3, all 3 proteins required for the progression of autophagy, allows MCL cells to undergo apoptosis upon exposure to the combination. Accordingly, it has been described that dual inhibitors of PI3K/mTOR kinases may induce autophagy as a central survival signal (40), pointing out that effective cell death in malignant cells with constitutive Akt activation would require the blockade of the 3 targets we describe herein: mTOR, Akt, and autophagy.

As autophagy is generally a survival pathway used by tumor cells to tolerate metabolic stress (22, 41), autophagy inhibitors, in combination with other agents, are expected to efficiently target therapy-resistant tumor cells in hypoxic tumor regions (37). Compounds such as hydroxychloroquine or chloroquine that block lysosome acidification and consequent autophagosome fusion, have been entered in a number of clinical trials in combination with standard or experimental agents (42). In hematologic malignancies, these agents are being tested in combination with the proteasome inhibitor bortezomib in multiple myeloma (NCT00568880; ref. 36) or with the histone deacetylase inhibitor vorinostat in chronic myeloid leukemia (43). These latest studies sustain the concept that autophagy is a mechanism of therapeutic resistance, and that hydroxy-

chloroquine can increase cytotoxicity by abrogation of autophagy. In accordance with this, we found that the addition of this agent to everolimus/Akti-1/2 combination fully activates the intrinsic apoptotic program in MCL cells primarily resistant to Akt/mTOR dual targeting.

In summary, we show for the first time that the use of an autophagy inhibitor may overcome resistance to the combination of everolimus and an isoselective Akt inhibitor in MCL cell lines and primary samples. The proposed prosurvival role of autophagy in Akt/mTOR compromised cells points out some potential opportunities and warrant further clinical activity of this triple combinational strategy in MCL patients.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Authors' Contributions

Conception and design: L. Rosich, D. Colomer, G. Roué

Development of methodology: L. Rosich, M. Lopez-Guerra, D. Colomer, G. Roué

Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): L. Rosich, D. Colomer, G. Roué

Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): L. Rosich, S. Xargay-Torrent, E. Campo, D. Colomer, G. Roué

Writing, review, and/or revision of the manuscript: L. Rosich, M. Lopez-Guerra, E. Campo, D. Colomer, G. Roué

Study supervision: D. Colomer, G. Roué

Revision of the final version of the manuscript: S. Xargay-Torrent, G. Roué

Acknowledgments

The authors thank Jocabed Roldán, Laura Jiménez, and Sandra Cabezas for expert technical assistance and Anna Bellmunt for her help in *in vitro* studies. Everolimus was kindly provided by Novartis. This work was carried out, in part, at the Esther Koplowitz Center, Barcelona.

Grant Support

Fondo de Investigación Sanitaria (PI09/0060; to G. Roué), Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF 09/9503; to D. Colomer), Redes Temáticas de Investigación Cooperativa de Cáncer from the Instituto de Salud Carlos III (RED 2006-20-014 to D. Colomer and 2006-20-039 to E. Campo), and Generalitat de Catalunya (2009SGR967 to D. Colomer). L. Rosich and S. Xargay-Torrent are recipients of predoctoral fellowships from IDIBAPS and Ministerio Ciencia e Innovación (FPU), respectively. M. López-Guerra has a contract from RED 2006-20-014.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received February 1, 2012; revised July 12, 2012; accepted August 2, 2012; published OnlineFirst August 9, 2012.

References

- Jares P, Colomer D, Campo E. Genetic and molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: perspectives for new targeted therapeutics. *Nat Rev Cancer* 2007;7:750–62.
- Perez-Galan P, Dreyling M, Wiestner A. Mantle cell lymphoma: biology, pathogenesis, and the molecular basis of treatment in the genomic era. *Blood* 2011;117:26–38.
- Drakos E, Rassidakis GZ, Medeiros LJ. Mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway signalling in lymphomas. *Expert Rev Mol Med* 2008;10:e4.
- Guertin DA, Sabatini DM. Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell* 2007;12:9–22.
- Sparks CA, Guertin DA. Targeting mTOR: prospects for mTOR complex 2 inhibitors in cancer therapy. *Oncogene* 2010;29:3733–44.
- Faivre S, Kroemer G, Raymond E. Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:671–88.
- Weniger MA, Wiestner A. Molecular targeted approaches in mantle cell lymphoma. *Semin Hematol* 2011;48:214–26.
- Dancey J. mTOR signaling and drug development in cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2010;7:209–19.
- O'Donnell A, Faivre S, Burris HA III, Rea D, Papadimitrakopoulou V, Shand N, et al. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study

- of the oral mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 2008;26:1588–95.
10. Witzig TE, Reeder CB, LaPlant BR, Gupta M, Johnston PB, Micallef IN, et al. A phase II trial of the oral mTOR inhibitor everolimus in relapsed aggressive lymphoma. *Leukemia* 2011;25:341–7.
 11. Ansell SM, Inwards DJ, Rowland KM Jr, Flynn PJ, Morton RF, Moore DF Jr, et al. Low-dose, single-agent temsirolimus for relapsed mantle cell lymphoma: a phase 2 trial in the North Central Cancer Treatment Group. *Cancer* 2008;113:508–14.
 12. Witzig TE, Geyer SM, Ghobrial I, Inwards DJ, Fonseca R, Kurtin P, et al. Phase II trial of single-agent temsirolimus (CCI-779) for relapsed mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2005;23:5347–56.
 13. Hess G, Herbrecht R, Romaguera J, Verhoef G, Crump M, Gisselbrecht C, et al. Phase III study to evaluate temsirolimus compared with investigator's choice therapy for the treatment of relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2009;27:3822–9.
 14. Meric-Bernstam F, Akcakanat A, Chen H, Do KA, Sangai T, Adkins F, et al. PIK3CA/PTEN mutations and Akt activation as markers of sensitivity to allosteric mTOR inhibitors. *Clin Cancer Res* 2012;18:1777–89.
 15. Lopiccolo J, Blumenthal GM, Bernstein WB, Dennis PA. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations. *Drug Resist Updat* 2008;11:32–50.
 16. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein S, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. (4th ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer ed.; 2008.
 17. Bellosillo B, Villamor N, Lopez-Guillermo A, Marce S, Bosch F, Campo E, et al. Spontaneous and drug-induced apoptosis is mediated by conformational changes of Bax and Bak in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;100:1810–6.
 18. Lee JS, Lee GM. Monitoring of autophagy in Chinese hamster ovary cells using flow cytometry. *Methods* 2012;56:375–82.
 19. O'Reilly KE, Rojo F, She QB, Solit D, Mills GB, Smith D, et al. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res* 2006;66:1500–8.
 20. Degtyarev M, De MA, Klumperman J, Lin K. Autophagy, an Achilles' heel AKTing against cancer? *Autophagy* 2009;5:415–8.
 21. Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E. Role of autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* 2007;7:961–7.
 22. Amaravadi RK, Yu D, Lum JJ, Bui T, Christophorou MA, Evan GI, et al. Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma. *J Clin Invest* 2007;117:326–36.
 23. Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell* 2010;140:313–26.
 24. Yamamoto A, Tagawa Y, Yoshimori T, Moriyama Y, Masaki R, Tashiro Y. Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell Struct Funct* 1998;23:33–42.
 25. Janku F, McConkey DJ, Hong DS, Kurzrock R. Autophagy as a target for anticancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2011;8:528–39.
 26. Costa LJ. Aspects of mTOR biology and the use of mTOR inhibitors in non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Treat Rev* 2007;33:78–84.
 27. Rudelius M, Pittaluga S, Nishizuka S, Pham TH, Fend F, Jaffe ES, et al. Constitutive activation of Akt contributes to the pathogenesis and survival of mantle cell lymphoma. *Blood* 2006;108:1668–76.
 28. Coiffier B, Ribrag V. Exploring mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibition for treatment of mantle cell lymphoma and other hematologic malignancies. *Leuk Lymphoma* 2009;50:1916–30.
 29. Haritunians T, Mori A, O'Kelly J, Luong QT, Giles FJ, Koeffler HP. Antiproliferative activity of RAD001 (everolimus) as a single agent and combined with other agents in mantle cell lymphoma. *Leukemia* 2007;21:333–9.
 30. Dal CJ, Zancai P, Terrin L, Guidoboni M, Ponzoni M, Pavan A, et al. Distinct functional significance of Akt and mTOR constitutive activation in mantle cell lymphoma. *Blood* 2008;111:5142–51.
 31. Gupta M, Hendrickson AE, Yun SS, Han JJ, Schneider PA, Koh BD, et al. Dual mTORC1/mTORC2 inhibition diminishes Akt activation and induces Puma-dependent apoptosis in lymphoid malignancies. *Blood* 2012;119:476–87.
 32. Sun SY, Rosenberg LM, Wang X, Zhou Z, Yue P, Fu H, et al. Activation of Akt and eIF4E survival pathways by rapamycin-mediated mammalian target of rapamycin inhibition. *Cancer Res* 2005;65:7052–8.
 33. Serra V, Markman B, Scaltriti M, Eichhorn PJ, Valero V, Guzman M, et al. NVP-BEZ235, a dual PI3K/mTOR inhibitor, prevents PI3K signaling and inhibits the growth of cancer cells with activating PI3K mutations. *Cancer Res* 2008;68:8022–30.
 34. Bhatt AP, Bhende PM, Sin SH, Roy D, Dittmer DP, Damania B. Dual inhibition of PI3K and mTOR inhibits autocrine and paracrine proliferative loops in PI3K/Akt/mTOR-addicted lymphomas. *Blood* 2010;115:4455–63.
 35. Bhende PM, Park SI, Lim MS, Dittmer DP, Damania B. The dual PI3K/mTOR inhibitor, NVP-BEZ235, is efficacious against follicular lymphoma. *Leukemia* 2010;24:1781–4.
 36. Amaravadi RK, Lippincott-Schwartz J, Yin XM, Weiss WA, Takebe N, Timmer W, et al. Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment. *Clin Cancer Res* 2011;17:654–66.
 37. White E, DiPaola RS. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15:5308–16.
 38. Huang S, Yang ZJ, Yu C, Sinicrope FA. Inhibition of mTOR kinase by AZD8055 can antagonize chemotherapy-induced cell death through autophagy induction and down-regulation of p62/sequestosome 1. *J Biol Chem* 2011;286:40002–12.
 39. Yazbeck VY, Buglio D, Georgakis GV, Li Y, Iwado E, Romaguera JE, et al. Temsirolimus downregulates p21 without altering cyclin D1 expression and induces autophagy and synergizes with vorinostat in mantle cell lymphoma. *Exp Hematol* 2008;36:443–50.
 40. Fan QW, Cheng C, Hackett C, Feldman M, Houseman BT, Nicolaidis T, et al. Akt and autophagy cooperate to promote survival of drug-resistant glioma. *Sci Signal* 2010;3:ra81.
 41. Kovacs JR, Li C, Yang Q, Li G, Garcia IG, Ju S, et al. Autophagy promotes T-cell survival through degradation of proteins of the cell death machinery. *Cell Death Differ* 2012;19:144–52.
 42. Solomon VR, Lee H. Chloroquine and its analogs: a new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies. *Eur J Pharmacol* 2009;625:220–33.
 43. Carew JS, Nawrocki ST, Kahue CN, Zhang H, Yang C, Chung L, et al. Targeting autophagy augments the anticancer activity of the histone deacetylase inhibitor SAHA to overcome Bcr-Abl-mediated drug resistance. *Blood* 2007;110:313–22.

Figure S1

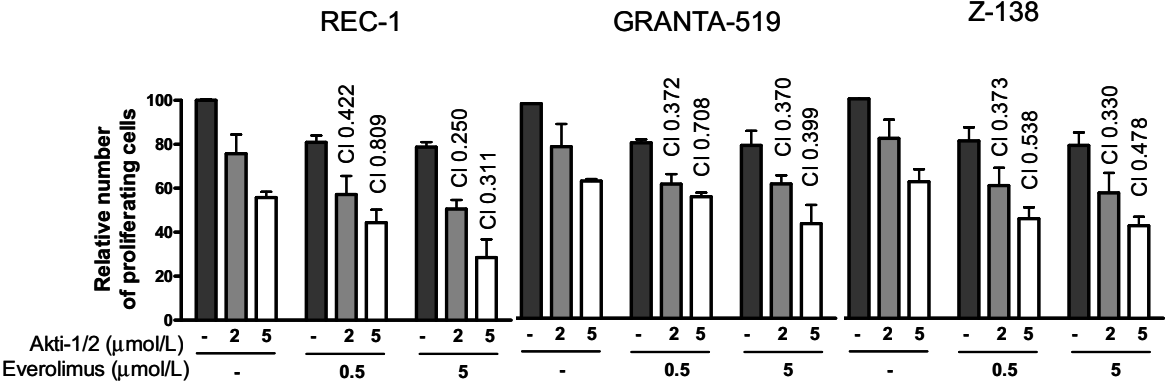


Figure S1. Synergistic effect of everolimus and the Akt inhibitor Akti-1/2. REC-1, GRANTA-519 and Z-138 cells were pretreated with Akti-1/2 for 3 h and incubated with everolimus for 24 h at the indicated doses. Drug cytostatic effect was analyzed by MTT proliferation assay. CI value is indicated for each combination.

Tercer article

La inhibició dual de PI3K/mTOR és requerida per interferir de forma eficaç en els senyals de supervivència del microambient en el limfoma de cèl·lules del mantell

Laia Rosich¹, Arnau Montraveta¹, Sílvia Xargay-Torrent¹, Mónica López-Guerra¹, Jocabed Roldán¹, Marta Aymerich^{2,3}, Itziar Salaverria³, Sílvia Beà³, Elías Campo^{2,3}, Patricia Pérez-Galán¹, Gaël Roué¹ i Dolores Colomer^{1,2}

¹Experimental Therapeutics in Lymphoid Malignancies Group, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Espanya

²Unitat d'hematopatologia, Departament de Patologia, Hospital Clínic, Barcelona, Espanya

³IDIBAPS, Universitat de Barcelona, Barcelona, Espanya

En revisió a *Clinical Cancer Research*

Resum

Objectiu: L'activació de la via de PI3K/AKT/mTOR contribueix a la patogènesi del limfoma de cèl·lules del mantell i a la resistència als fàrmacs. Malgrat tot, l'ús dels inhibidors de mTOR com a monoteràpia ha obtingut una limitada eficàcia clínica degut a la reactivació compensatòria de la via després del tractament. La inhibició selectiva de PI3K o la inhibició catalítica dual PI3K/mTOR són diferents aproximacions desenvolupades per aconseguir un bloqueig de la via més efectiu. Nosaltres hem investigat el potencial terapèutic de l'inhibidor de mTORC1 everolimus, l'inhibidor de totes les isoformes de PI3K NVP-BKM120 i l'inhibidor dual PI3K/mTOR NVP-BEZ235.

Disseny experimental: Es va realitzar un estudi comparatiu d'everolimus, NVP-BKM120 i NVP-BEZ235 mitjançant l'anàlisi del perfil d'expressió gènica en dues mostres primàries de MCL. La sensibilitat a aquests agents es va avaluar en 11 casos primaris de MCL mitjançant citometria de flux i cocultiu amb cèl·lules estromals. L'activitat d'aquests compostos *in vitro* es va determinar mitjançant Western blot, PCR quantitativa, assaigs de quimiotaxis, polimerització d'actina i invasió envers la

quimiocina CXCL12, i finalment, l'estudi de l'angiogènesi, mitjançant l'anàlisi de formació de tubs amb la línia cel·lular HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*).

Resultats: Vam trobar que NVP-BEZ235 era més potent que everolimus o NVP-BKM120 en inhibir la via de senyalització de PI3K/AKT/mTOR i en induir citotoxicitat en presència de cèl·lules estromals. Entre els tres compostos, NVP-BEZ235 va induir el major nombre de canvis en el perfil d'expressió gènica. Amb la validació funcional vam demostrar per primera vegada que NVP-BEZ235 inhibia l'angiogènesi, la migració i la invasió tumoral en cèl·lules primàries de MCL. A més, NVP-BEZ235 va ser l'únic compost capaç de bloquejar la senyalització de IL4 i IL6/STAT3, interleucines fonamentals per mantenir la supervivència de les cèl·lules tumorals en el seu microambient.

Conclusions: Les nostres dades donen suport a l'ús de l'inhibidor dual de PI3K/mTOR NVP-BEZ235 com una prometedora aproximació per interferir en els processos relacionats amb el microambient en el MCL.

Dual PI3K/mTOR inhibition is required to effectively impair microenvironment survival signals in MCL

Laia Rosich¹, Arnau Montraveta¹, Sílvia Xargay-Torrent¹, Mónica López-Guerra¹, Jocabed Roldán¹, Marta Aymerich^{2,3}, Itziar Salaverria³, Sílvia Beà³, Elías Campo^{2,3}, Patricia Pérez-Galán¹, Gaël Roué¹, and Dolors Colomer^{1,2}

¹Experimental Therapeutics in Lymphoid Malignancies Group, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

²Hematopathology Unit, Department of Pathology, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

³IDIBAPS, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Running title: Dual PI3K/mTOR inhibition in MCL

Keywords: NVP-BE2235, MCL, invasion, cytokine signaling

Financial support: This study was supported by research funding from Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF09/9503 and SAF 12/31242), Redes Temáticas de Investigación Cooperativa de Cáncer from the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Spanish Ministry of Economy and Competitiveness & European Regional Development Fund (ERDF) “Una manera de hacer Europa” RD12/0036/0004, RD12/0036/0036 and Generalitat de Catalunya 2009SGR967 (D.C). M.L-G has a contract from Fundación Científica de la Asociación Española contra el Cáncer. A.M is recipient of predoctoral fellowship FPI from Ministerio de Ciencia e Innovación. P.P-G holds a contract from Ramón y Cajal program (RYC2009-05134) and a grant from Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF 11/29326). GR holds a contract from Miguel Servet program and a grant from Fondo de Investigación Sanitaria (PI12/01847).

Corresponding author: Dolors Colomer, PhD, Hematopathology Unit, Hospital Clínic, Villarroel, 170, 08036 Barcelona, Spain; Phone/Fax: 34-932275572; e-mail: dcolomer@clinic.cat

Conflict of interest: The authors declare no competing financial interests.

TRANSLATIONAL RELEVANCE

Mantle cell lymphoma (MCL) is an aggressive lymphoid neoplasm that lacks effective therapy. Antitumor activity has been observed with mTOR inhibitors as monotherapy. However, several signaling feedback loops might attenuate the effectiveness of these compounds. Here, we report that targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway at multiple levels with the dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 is likely to be a more effective strategy for the treatment of MCL than single inhibition of these kinases. We show that NVP-BEZ235 inhibits IL4 and IL6/STAT3 signaling, which compromise the therapeutic effect of chemotherapy in MCL. Furthermore, NVP-BEZ235 impairs angiogenesis, migration and tumor invasiveness in primary MCL cells. This study thus supports the use of NVP-BEZ235 as a promising approach to interfere with the microenvironment-related processes in MCL.

ABSTRACT

Purpose: Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/Akt/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway activation contributes to mantle cell lymphoma (MCL) pathogenesis and drug resistance. However, the use of mTOR inhibitors as single agents has shown limited clinical efficacy in relation to drug activation of feedback loops. Selective PI3K inhibition or dual PI3K/mTOR catalytic inhibition are different therapeutic approaches developed to achieve effective pathway blockage. We investigated the therapeutic potential of the mTOR inhibitor everolimus, the pan-PI3K inhibitor NVP-BKM120 and the dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235.

Experimental Design: We performed a comparative analysis of everolimus, NVP-BKM120 and NVP-BEZ235 by using a gene expression profiling approach in primary MCL cells. Activity of the three drugs *in vitro* was evaluated by flow cytometry, Western blot, real-time PCR, chemotaxis, actin polymerization, invasion and HUVEC tube formation assays.

Results: We found NVP-BEZ235 to be more powerful than everolimus or NVP-BKM120 in PI3K/Akt/mTOR signaling inhibition and in cytotoxicity induction in the presence of stromal cells. Among the three drugs, NVP-BEZ235 induced the highest number of changes in gene expression profile. Functional validation demonstrated for the first time that NVP-BEZ235 inhibited angiogenesis, migration and tumor invasiveness in MCL cells. Of special interest, NVP-BEZ235 was the only drug able to block IL4 and IL6/STAT3 signaling and MCL tumor thriving in its microenvironment.

Conclusions: Our findings support the use of the dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 as a promising approach to interfere with the microenvironment-related processes in MCL.

INTRODUCTION

Mantle cell lymphoma (MCL) is an aggressive B-lymphoid neoplasm with poor response to conventional chemotherapy and short survival. It is genetically characterized by the chromosomal translocation t(11;14)(q13;q32), which dysregulates cyclin D1 expression. Although cyclin D1 up-regulation is detected in nearly all MCL, it is not sufficient for the development of the disease. Additional chromosome alterations that target genes involved in molecular pathways, such as cell cycle, DNA damage response and cell survival, are frequently found in MCL.(1)

Constitutive activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), Akt and mammalian target of rapamycin (mTOR) is known to confer drug resistance to many types of cancer, including MCL. This pathway integrates signals from extracellular stimuli to regulate fundamental cellular processes, including mRNA translation, cell cycle progression and cell survival.(2) MCL tumors frequently express the inactive phosphorylated form of PTEN, a negative PI3K regulator, thereby contributing to constitutive PI3K signaling.(3) In addition, gene amplification of *PIK3CA* (PI3K p110 catalytic subunit alpha) has also been described in MCL.(4)

Selective targeting of PI3K has demonstrated the potential to inhibit this pathway. However, the first p110 δ isoform-selective PI3K inhibitor, idelalisib (GS-1101), with notable results in indolent non-Hodgkin lymphoma(5) and chronic lymphocytic leukemia,(6) showed modest responses in patients with MCL.(7) Moreover, it has been postulated that the increased expression of PI3K p110 α isoform in MCL particularly at relapse might play a role in MCL progression,(8) supporting the use of pan-PI3K inhibitors. Currently, multiple PI3K inhibitors are under clinical investigation.(9) Among them, NVP-BKM120 has shown efficacy both *in vitro*(10-13) and *in vivo*(14) in several malignancies.

Allosteric mTOR inhibitors, which include rapamycin (sirolimus) and its analogues (temsirolimus, everolimus and ridaforolimus), mainly target mTORC1 and also show single agent activity in a range of B-cell malignancies.(15) Temsirolimus was approved by the European Medicines Agency for the treatment of relapsed and refractory MCL, while ridaforolimus and everolimus have been entered in several clinical trials.(16) However, mTORC1-specificity of rapamycin analogues may limit its efficacy due to

feedback activation of upstream PI3K signaling, leading to Akt hyperactivation.(17) In this sense, we previously reported that activity of the oral mTOR inhibitor everolimus, is limited by Akt rephosphorylation and that a selective Akt inhibitor overcomes this compensatory reactivation.(18) In this context, dual PI3K/mTOR inhibitors have been synthesized, which, unlike rapamycin and its analogues, are ATP competitive inhibitors and target the catalytic site of both kinases.(9) These dual PI3K/mTOR inhibitors have increased antitumor effects due to their ability to suppress the prosurvival regulatory feedback.(19) NVP-BEZ235 is an orally bioavailable imidazoquinoline derivative that inhibits the kinase activity of PI3K, mTORC1 and mTORC2.(20) It has shown pre-clinical activity against a range of lymphoid malignancies(13;19;21-23) and is currently undergoing phase I evaluation in acute leukemia (NCT01756118). NVP-BEZ235 also exhibited antiproliferative effect in MCL cell lines by downregulating Mcl-1(24) and synergisms with conventional agents.(25;26)

In this study, we compared the therapeutic potential of the novel dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 to NVP-BKM120 (pan-class I PI3K inhibitor) and everolimus (mTORC1 inhibitor) in primary MCL samples. Our study supports the view that the concurrent suppression of PI3K and mTORC2, in addition to mTORC1, is likely to be a more effective strategy for the treatment of MCL than single inhibition of these kinases.

METHODS

Culture of primary and stromal cells

Primary cells from 11 patients diagnosed of MCL were obtained. The ethical approvals for this project including the informed consent of the patients were granted following the guidelines of the Hospital Clínic Ethics Committee. The characteristics of these patients are listed in **Table 1**. The DNA copy number alterations and mutational profile of these samples were previously characterized using Affymetrix 6.0 SNP arrays and whole-exome sequencing.(27) Primary cryopreserved MCL cells were cultured as previously described.(18) When indicated, MCL cells were cocultured with the human bone marrow-derived stromal cell line HS-5 (ATCC) in 96-well plates as described.(10)

Treatments and flow cytometry analysis of apoptosis

Primary MCL cells were incubated as indicated with 5 μ M everolimus, 1 μ M NVP-BEZ235 or 1 μ M NVP-BKM120 (all drugs kindly provided by Novartis). When indicated, cells were simultaneously incubated with interleukin 4 (IL4; 20 ng/mL) or interleukin 6 (IL6; 40 ng/mL) and the drugs. Cell viability was quantified by flow cytometry analysis after double labeling of cells for phosphatidylserine exposure with Annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC), and for nuclear membrane permeabilization with propidium iodide (PI; eBioscience). Labeled cells were acquired on an Attune cytometer (Life Technologies).

Western blot analysis

Whole protein extraction and Western blot analysis were done as previously described.⁽¹⁸⁾ Membranes were probed with the following primary antibodies from Cell Signaling Technology (Danvers): phospho-Akt (Ser473), phospho-ribosomal protein S6 (RPS6; Ser235/236), phospho-4EBP1 (Thr37/46), phospho-eIF4E (Ser209), phospho-STAT3 (Tyr705, clone D3A7), phospho-STAT6 (Tyr641), Akt, RPS6, 4EBP1, eIF4E, STAT3 (clone 79D7) and STAT6 (clone D3H4). Horseradish peroxidase-labeled anti-mouse IgG (Sigma) and anti-rabbit IgG (Cell Signaling Technology) were used as secondary antibodies. Ratio between phosphorylated and total protein levels was calculated and relative protein quantification in treated versus control extracts was conducted with Image Gauge software (Fujifilm). Equal protein loading was confirmed by re-probing membranes with anti- β -actin or anti- α -tubulin antibodies (Sigma).

Gene expression profiling (GEP)

Total RNA was isolated from primary MCL cells, previously exposed to 5 μ M everolimus, 1 μ M NVP-BEZ235 or 1 μ M NVP-BKM120 for 8 hours, using the TRIzol reagent (Life Technologies) according to manufacturer's instructions. RNA integrity was examined with the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) and 150 ng of high quality RNA were used to generate biotin-labeled cRNA. After cRNA fragmentation, samples were hybridized on the HT HG-U219 GeneChip perfect-match-only array plate (Affymetrix) following standardized protocols. Scanning was processed in the Gene Titan instrument (Affymetrix) and analyzed with GeneChip Command

Console Software (AGCC) (Affymetrix). Raw data were normalized using the Robust Multichip Analysis (RMA) algorithm implemented in the Expression Console Software v1.1 (Affymetrix). Raw data have been deposited in the Gene Expression Omnibus Database (accession number GSE53309).

Unsupervised hierarchical clustering of the 10000 high-standard deviation genes was performed using Pearson's correlation coefficient and average linkage, as the similarity measure and clustering algorithm respectively, within TM4-MultiExperiment Viewer platform. Genes modulated by a specific treatment were displayed with Cluster (version 2.11) and TreeView (version 1.6) softwares (Eisen Laboratory). The scaled expression value is plotted in red-blue color scale with red indicating high gene expression and blue indicating low gene expression.

Gene set enrichment analysis (GSEA)

Significant gene signatures differentially regulated by each drug *versus* untreated cells were identified with GSEA version 2.0 (Broad Institute at MIT; <http://www.broadinstitute.org/gsea/>) using the C2 (curated gene sets) collection from the Molecular Signature Database v2.5. A two-class analysis with 1000 permutations of gene sets and a weighted metric was used. Gene sets with a false discovery rate (FDR) below 0.05 were considered significant.

mRNA quantification by real-time PCR

Total RNA was extracted using TRIzol method (Life technologies) as above. In order to eliminate any traces of DNA, RNA was incubated with the DNA-free kit (Life Technologies). DNA-free RNA (0.5-1 µg) was retrotranscribed to cDNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Life Technologies). Then, samples were processed to Specific Target Amplification using the TaqMan PreAmp Master Mix and the TaqMan Gene Expression Assays (Life Technologies) for a multiplexed preamplification of the targets of interest (Supplementary Table S1). Finally, samples were diluted 1/5 in Tris-EDTA buffer and 48.48 Dynamic Array – Gene Expression IFC (Fluidigm Corporation) was run as recommended by the manufacturer, with the same TaqMan Gene Expression Assays as before. The relative expression of each gene was quantified by the comparative cycle threshold (Ct) method ($\Delta\Delta Ct$) using *GUSB* as

endogenous control. mRNA expression levels are given in arbitrary units, taking as a reference the untreated control sample.

Chemotaxis and actin polymerization assays

CXCL12-induced chemotaxis and actin polymerization assays were performed as previously described.⁽¹⁰⁾ Migration is represented as the relative number of migrating cells, taking as a reference the untreated control without CXCL12. As for actin polymerization assays, results are plotted relative to the mean fluorescence of the sample before the addition of CXCL12.

Cell invasion assay

Primary MCL cells were serum-starved for 1.5 hours in FBS-free RPMI 1640 (10^7 cells/mL). Next, cells were diluted (5×10^6 cells/mL with 0.5 % BSA in RPMI 1640), incubated with the corresponding drugs for 1 hour and afterwards, 100 μ L were added to the top chambers of rehydrated BioCoat Matrigel Invasion Chambers (Becton Dickinson). Chambers had been previously transferred to wells containing 600 μ L of 0.5 % BSA in RPMI 1640 with 200 ng/mL of CXCL12. Input cell count was obtained from adding 100 μ L of cell suspension to wells containing 600 μ L of 0.5 % BSA in RPMI 1640. After 24 hours of incubation, 100 μ L were collected in triplicate from each lower chamber and input well, viable cells gated in a FSC/SSC plot and counted on an Attune cytometer under constant flow rate. Invasion is represented as the ratio between invasive cells and input viable cells, relative to the untreated control.

HUVEC tube formation assay

HUVEC cells, kindly provided by Dr MC Cid (IDIBAPS), were cultured in RPMI 1640 supplemented with 20 % defined bovine calf serum (Thermo Fisher Scientific), 0.2 mg/mL endothelial cell growth supplement (Becton Dickinson), 5 units/mL sodium heparin (EMD Millipore), 2 mM glutamine, 100 units/mL penicillin-streptomycin, 50 μ g/mL gentamycin (Life Technologies) and 2.5 μ g/mL fungizone (Sigma). Supernatant from primary MCL cells (2×10^6 cells/mL) was collected after 8 hours of incubation with drugs. Twenty-four-well plates were coated with 300 μ L of Matrigel (Becton Dickinson) and allowed to polymerize for 30 minutes at 37°C. Subsequently, 500 μ L of the

supernatant of interest and 500 μ L of HUVEC cells (0.8×10^5 cells/mL) in its medium were added into each culture well. After 24 hours of incubation, the number of branch points was quantified as the mean of 5 randomly chosen fields from each well. Images were taken at x40 magnification in a DM IL LED microscope coupled to a DFC295 camera with Leica Application Suite v 3.7 software (Leica).

Statistical analysis

Nonparametric Wilcoxon signed rank test was used to compare the mean of a set of samples to a theoretical value. Comparison between two groups of samples was evaluated by non-parametric Wilcoxon paired t-test. Statistical analysis was conducted with the use of GraphPad Prism 4.0 software (GraphPad Software).

RESULTS

Superior inhibitory activity of NVP-BEZ235 towards PI3K/Akt/mTOR signaling compared to everolimus and NVP-BKM120 in primary MCL cells

Cells from 11 primary MCL cases were exposed to everolimus (5 μ M), NVP-BEZ235 (1 μ M) or NVP-BKM120 (1 μ M) for 48 hours and cytotoxicity was measured by Annexin V labeling (Table 1). As shown on Figure 1A, NVP-BEZ235 induced a high cytotoxic effect with a mean response of 40.80 ± 21.30 % which was significantly higher than that observed with everolimus (mean response of 22.74 ± 17.63 %; **, $P < 0.01$). The antitumor effect of the pan-PI3K inhibitor NVP-BKM120 reached 31.93 ± 17.31 %. The sensitivity to these drugs was not related to genomic alterations of PI3K/Akt/mTOR (*PTEN* deletion, *PIK3CA* and *AKT1* amplifications), *SOX11* expression or *TP53* alterations (Table 1).

We then studied the ability of these drugs to overcome stroma-mediated resistance. As expected, coculture of primary MCL cells with the stromal cell line HS-5 protected MCL cells from spontaneous apoptosis after 48 hours of HS-5 coculture (**, $P < 0.01$; data not shown). Of note, the three compounds were able to induce apoptosis with the same efficiency despite the presence of stromal cells, although only NVP-BEZ235 enhanced MCL cell killing in HS-5 coculture (Figure 1B; *, $P < 0.05$).

We further evaluated the effect of these compounds in the PI3K-mediated signaling. As expected, everolimus blocked the activation of the mTOR downstream target RPS6 but barely modified phospho-Akt levels, consistent with the Akt rephosphorylation after exposure to everolimus.(17;18) We also observed that NVP-BKM120 downregulated the phosphorylation levels of Akt and the mTOR targets, RPS6 and EIF4E, while the dual inhibitor NVP-BEZ235 demonstrated the greater inhibitory activity toward PI3K/Akt/mTOR signaling pathway, with a complete reduction of the phosphorylation levels of Akt, 4EBP1, RPS6 and EIF4E (Figure 1C).

Thus, in MCL primary cells, dual PI3K/mTOR inhibition is the best strategy to efficiently block PI3K-mediated signaling and to induce major apoptosis, even in the presence of stroma.

NVP-BEZ235 modulates genes related to inflammation, cytokine signaling, angiogenesis and tumor invasiveness

We next analyzed the impact of these PI3K/Akt/mTOR inhibitors on GEP of two representative MCL cases (MCL n^o.1 and n^o.2, Table 1) treated for 8 hours with the corresponding drugs. We selected the common genes between the two MCL cases that were differentially expressed from each treatment compared to the control, with an absolute fold change above 1.5. Everolimus treatment induced the lowest number of gene modulations (118 genes upregulated and 68 downregulated), whereas after NVP-BKM120 treatment 254 genes were upregulated and 290 genes were downregulated. Interestingly, NVP-BEZ235 modulated the highest number of genes, being 319 genes upregulated and 399 downregulated (Figure 2A). Unsupervised hierarchical clustering in each case showed that control and everolimus-treated samples clustered together, consistent with the low number of genes modified by the drug. NVP-BKM120-treated samples clustered with the previous control-everolimus group. Importantly, NVP-BEZ235-treated samples showed the most different gene expression pattern, as indicated by the independent branch of the dendogram (Supplementary Figure S1). We then selected the genes specifically modulated by NVP-BEZ235 that were not modified by the other inhibitors. Figure 2B shows the heatmap of these 619 genes (281 genes upregulated and 338 genes downregulated) in a representative primary MCL case.

As NVP-BEZ235 came out to be the compound that induces more dramatic changes in GEP, we next explored the biological networks involved in NVP-BEZ235 treatment in MCL cells. As shown in Figure 2C, using GSEA (with FDR < 0.05 and NES < -1.7), we identified several gene sets negatively enriched in NVP-BEZ235-treated cells that were related to respiratory electron transport, glucose metabolism, B-cell receptor signaling, cell cycle and proliferation, all of them pathways well-known to be affected by PI3K/Akt/mTOR inhibitors.(2) In addition, we also identified other pathways negatively enriched in NVP-BEZ235-treated cells involved in hypoxia response, angiogenesis, cell invasion, cytokines and inflammation, such as NF- κ B pathway, TOLL pathway, IL4 and IL6 signaling, and STAT3 pathway. Complete information of the gene signatures is shown in Supplementary Table S2.

Altogether, these findings suggest that improved antitumor activity of NVP-BEZ235 in MCL is mostly associated with its capacity to modulate a high number of genes related to angiogenic and invasive processes, inflammation and cytokine signaling.

NVP-BEZ235 blocks IL4 and IL6 signaling in MCL cells

In order to validate the relevance of the GSEA gene categories related to inflammation and cytokine signaling, we selected a subset of the top leading edge genes for further analysis in 10 primary MCL cells exposed to the different drugs (Supplementary Table S1). Several genes related to the IL4, IL6 and STAT3 signatures, *HCK* (**, $P < 0.01$), *IL6* (*, $P < 0.05$), *IRF1* (*, $P < 0.05$) and *SP110* (**, $P < 0.01$) were validated as being downregulated only by NVP-BEZ235 treatment. *STAT1* was downregulated by both everolimus (*, $P < 0.05$) and NVP-BEZ235 (**, $P < 0.01$), although NVP-BEZ235 effect was more pronounced. Statistical significance was also achieved with *TLR4* (**, $P < 0.01$), from the TOLL pathway signature (Figure 3A).

To further study the effect of NVP-BEZ235 in interleukin signaling, primary MCL cells were exposed to the corresponding drugs in the presence or absence of IL4 or IL6. We observed that IL4 protected MCL cells from spontaneous apoptosis (*, $P < 0.05$; data not shown). Interestingly, while the cytotoxic effect of everolimus and NVP-BKM120 was almost completely reverted by IL4 (**, $P < 0.01$ for everolimus; *, $P < 0.05$ for NVP-BKM120), no alteration of NVP-BEZ235 cytotoxicity was observed in the presence of IL4 (Figure 3B). It is known that the activating phosphorylation of STAT proteins can be

triggered by cytokines such as IL4 and IL6.(28) As shown in Figure 3C, incubation of primary MCL cells with IL4 resulted in the phosphorylation of downstream STAT6 and, in a minor degree, of STAT3. Consistent with GEP data, NVP-BEZ235 was the only drug able to block STAT6 and STAT3 phosphorylation after IL4 stimulation, indicating that this compound is interfering IL4 signaling in primary MCL cells. In the case of IL6 stimulation, despite no differences in viability were observed after treatment with the corresponding drugs (Figure 3D), only NVP-BEZ235 was able to decrease the phosphorylation levels of STAT3 induced by IL6 (Figure 3E).

These data demonstrate that only the dual inhibitor NVP-BEZ235 is able to hamper IL4 and IL6 signaling in MCL cells compared to everolimus or NVP-BKM120.

PI3K/Akt/mTOR inhibitors effect on CXCL12-induced MCL cell migration and invasion and tumor angiogenesis

To further validate GSEA results, we next explored the role of these PI3K/Akt/mTOR inhibitors in invasive and angiogenic processes in MCL. As tumor invasiveness couples with the migratory ability of cells, we first investigated the effect of these drugs on actin polymerization and cell chemotaxis in response to CXCL12. As shown in Figure 4A, CXCL12 induced a notable increase in actin polymerization that was significantly decreased only after NVP-BEZ235 incubation (*, $P < 0.05$). MCL cells were then assayed for chemotaxis toward CXCL12. Figure 4B shows that everolimus and NVP-BEZ235 significantly reduced the number of migrating MCL cells in the presence of the chemokine (59.80 ± 6.87 % of inhibition for everolimus, 66.87 ± 4.78 % of inhibition for NVP-BEZ235; *, $P < 0.05$), whereas NVP-BKM120 had no significant effect. We then examined the effect of these drugs on MCL invasive properties with matrigel-coated invasion chambers that simulate extracellular matrix. In response to CXCL12, untreated MCL cells passed through matrigel, however, NVP-BEZ235 significantly reduced CXCL12-induced invasion (*, $P < 0.05$) whereas NVP-BKM120 and everolimus did not (Figure 4C).

Finally, we analyzed the effect of these drugs on tumor angiogenesis with HUVEC tube formation assay. Supernatants from MCL cells treated with NVP-BEZ235 were significantly less angiogenic than those from untreated MCL cells (*, $P < 0.05$), although

MCL cells exposed to everolimus or NVP-BKM120 showed a tendency but not a significant decrease in the angiogenic activity on HUVEC cells (Figure 5A).

All these results show that NVP-BEZ235 exerts a significant reduction of migratory, invasive and angiogenic properties of MCL cells.

DISCUSSION

MCL is characterized by an unfavorable clinical evolution being one of the most aggressive B-cell lymphomas. Furthermore, current conventional therapies are not able to control the long term evolution of the disease and the tumors present frequent relapses. The constitutive activation of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway, which is involved in the regulation of essential cellular functions, is commonly observed in many tumors, including MCL, and is critical for tumor progression and resistance to antineoplastic drugs.(3;9)

Antitumor activity has been observed with mTOR inhibitors as monotherapy or in combination. However, only a portion of relapsed/refractory MCL patients respond to the rapamycin analogues and the response is generally not durable.(29-33) It has been reported that several signaling feedback loops might attenuate the effectiveness of these compounds,(17) so dual catalytic inhibition of PI3K/mTOR could be a good strategy to address PI3K/Akt/mTOR resistance mechanisms.

Here, we have compared the effect of everolimus, an mTORC1 inhibitor, NVP-BEZ235, a dual inhibitor of PI3K and mTOR (mTORC1 and mTORC2) and NVP-BKM120, a pan-PI3K inhibitor, in primary MCL cells. We observed that NVP-BEZ235 was more powerful than everolimus or NVP-BKM120 in PI3K/Akt/mTOR signaling inhibition and in cytotoxicity induction in the presence of stromal cells. Accordingly, the ability of NVP-BEZ235 to overcome microenvironment signals has been previously reported in MCL cell lines.(25) Our results confirmed for the first time this effect in primary MCL cells. Thus, the use of the PI3K/mTOR dual inhibitor would support the idea that targeting PI3K/Akt/mTOR at multiple levels might be more efficient at inducing apoptosis in the presence of microenvironment signals and to prevent the development of drug resistance. This is in agreement with a previous report of our group, where we showed

that dual mTORC1 and Akt targeting with everolimus and an isoselective Akt inhibitor, respectively, exerted synergistic antitumor activity in MCL.(18)

Based on the differences in drug-related cytotoxic effect, GEP approach revealed that NVP-BEZ235 treatment was associated with the highest number of modulated genes compared to NVP-BKM120 and everolimus, being the MTORC1 inhibitor the drug that induced the lowest number of gene changes. Consistently, NVP-BEZ235-treated MCL samples downregulated well-known pathways affected by PI3K/Akt/mTOR inhibitors.(2) In addition, we observed inhibition of pathways involved in angiogenesis, cell invasion and inflammation processes. Importantly, NVP-BEZ235 treatment downregulated IL6 and IL4 cytokine signaling pathways confirming an essential contribution of STAT family to the PI3K/mTOR pathway(34) in MCL.

Interactions between the neoplastic B cells and accessory cells in tissue microenvironments, such as the lymphatic tissues, are critical for disease progression and chemoresistance in various B-cell malignancies.(35) In MCL, STAT3 activation has shown to be either constitutively through a cytokine autocrine loop of IL6 and/or IL10 secretion or in response to B-cell receptor engagement.(36) Moreover, IL6-mediated STAT3 activation has recently been found to compromise the therapeutic effect of chemotherapy in MCL.(37) In this context, we demonstrated that NVP-BEZ235 was able to decrease STAT3 signaling in the presence of IL6, in contrast to everolimus or NVP-BKM120. Besides, NVP-BEZ235 also downregulated the gene expression levels of *HCK*, *IRF1*, *SP110* and *STAT1*, all genes related to the IL6 signaling pathway. As human bone marrow stromal cells have been described to secrete IL6,(38;39) we hypothesize that NVP-BEZ235 increased cytotoxicity in HS-5 coculture could be related to its ability to interfere with cytokine signaling.

Growth-promoting activity of IL4 by means of STAT6 phosphorylation has also been described in B-cell lymphomas.(34;40-42) Interestingly, NVP-BEZ235 effectively overcame the prosurvival effect of IL4 as well as completely inhibited IL4 signaling. In addition, TLR4 levels were also found to be downregulated by NVP-BEZ235 treatment. A previous report described that the activation of TLR4 signaling in MCL cells, one of the predominant TLRs in these cells, induced proliferation and secretion of cytokines like IL6 and VEGF.(43) Recently, a whole-exome sequencing study detected recurrent activating mutations in TLR2 that increased the IL6 production among other

chemokines.(27) Moreover, NVP-BEZ235 was found to inhibit multiple paracrine and autocrine survival growth factors in PI3K/Akt/mTOR-addicted lymphomas.(19) Thus, our data support that NVP-BEZ235 treatment may interfere with cytokine signaling in MCL, which is crucial for keeping tumor thriving in its microenvironment.

A key event in the development and progression of cancer is the potential of tumor cells to migrate and invade into surrounding tissues. In this context, we show for the first time that NVP-BEZ235 clearly reduced the migratory and invasive potential of MCL cells, as indicated in GEP data. Recently, ibrutinib(44) and sorafenib(45) have been described to inhibit migration of MCL cells, indicating the potential of the BCR-associated kinase inhibitors in modulating the homing of MCL cells into lymphoid tissues. Besides migratory and invasive processes, angiogenesis appears to be of particular importance in the physiopathology of lymphomas, as disease progression was found to correlate with increased angiogenic activity.(46) In this sense, involvement of PI3K/Akt/mTOR pathway in cell invasion and angiogenesis has been proposed in follicular lymphoma.(47) Here, we provide the first evidence of NVP-BEZ235 ability to interfere with the angiogenic process. This effect could be related to the observed downregulation of STAT3 signaling, as it was demonstrated to participate in angiogenic responses *in vivo*.(48)

MCL is one of the most difficult types of lymphoma to treat, which is due in part to its frequent relapses and progressive resistance to treatment suggesting that the microenvironment may sustain residual tumor cells resistant to chemotherapy.(1) Our findings suggest the use of NVP-BEZ235 as a therapeutic strategy to interfere with malignant cell/microenvironment interactions, thanks to its involvement in essential processes such as angiogenesis, migration, invasiveness and cytokine signaling. We propose that targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway at multiple levels may therefore provide a more effective antitumor activity than the current strategies using mTOR inhibitors in MCL.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Laura Jiménez and Sandra Cabezas for their technical support, and Dr Maria C. Cid for providing HUVEC cells. This work was carried out at the Esther

Koplowitz Center, Barcelona. Everolimus, NVP-BKM120 and NVP-BEZ235 were kindly provided by Novartis.

REFERENCES

- (1) Jares P, Colomer D, Campo E. Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma. *J Clin Invest* 2012;**122**:3416-23.
- (2) Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2009;**8**:627-44.
- (3) Dal CJ, Zancai P, Terrin L, Guidoboni M, Ponzoni M, Pavan A, et al. Distinct functional significance of Akt and mTOR constitutive activation in mantle cell lymphoma. *Blood* 2008;**111**:5142-51.
- (4) Psyrris A, Papageorgiou S, Liakata E, Scorilas A, Rontogianni D, Kontos CK, et al. Phosphatidylinositol 3'-kinase catalytic subunit alpha gene amplification contributes to the pathogenesis of mantle cell lymphoma. *Clin Cancer Res* 2009;**15**:5724-32.
- (5) Gopal A, Kahl BS, de Vos S, Wagner-Johnston ND, Schuster SJ, Blum KA, et al. Mature Response Data From a Phase 2 Study Of PI3K-Delta Inhibitor Idelalisib In Patients With Double (Rituximab and Alkylating Agent)-Refractory Indolent B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma (iNHL). ASH Annual Meeting Abstracts 2013.
- (6) Coutre SE, Leonard JP, Barrientos JC, de Vos S, Flinn I, Furman RR, et al. Clinical Activity Of Idelalisib (GS-1101), a Selective Inhibitor Of PI3Kd, In Phase 1 and 2 Trials In Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL): Effect Of Del(17p)/TP53 Mutation, Del(11q), IGHV Mutation, and NOTCH1 Mutation. ASH Annual Meeting Abstracts 2013.
- (7) Kahl B, Byrd JC, Flinn IW, Wagner-Johnston N, Spurgeon S, Benson DM, Jr., et al. Clinical Safety and Activity In a Phase 1 Study of CAL-101, An Isoform-Selective Inhibitor of Phosphatidylinositol 3-Kinase P110{delta}, In Patients with Relapsed or Refractory Non-Hodgkin Lymphoma. ASH Annual Meeting Abstracts 2010;**116**:1777.
- (8) Iyengar S, Clear A, Bodor C, Maharaj L, Lee A, Calaminici M, et al. P110alpha-mediated constitutive PI3K signaling limits the efficacy of p110delta-selective inhibition in mantle cell lymphoma, particularly with multiple relapse. *Blood* 2013;**121**:2274-84.
- (9) Rodon J, Dienstmann R, Serra V, Tabernero J. Development of PI3K inhibitors: lessons learned from early clinical trials. *Nat Rev Clin Oncol* 2013;**10**:143-53.
- (10) Rosich L, Saborit-Villarroya I, Lopez-Guerra M, Xargay-Torrent S, Montraveta A, Aymerich M, et al. The phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor NVP-BKM120 overcomes resistance signals derived from microenvironment by regulating the Akt/FoxO3a/Bim axis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica* 2013;**98**:1739-47.

- (11)Zheng Y, Yang J, Qian J, Zhang L, Lu Y, Li H, et al. Novel phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor NVP-BKM120 induces apoptosis in myeloma cells and shows synergistic anti-myeloma activity with dexamethasone. *J Mol Med (Berl)* 2012;**90**:695-706.
- (12)Ren H, Zhao L, Li Y, Yue P, Deng X, Owonikoko TK, et al. The PI3 kinase inhibitor NVP-BKM120 induces GSK3/FBXW7-dependent Mcl-1 degradation, contributing to induction of apoptosis and enhancement of TRAIL-induced apoptosis. *Cancer Lett* 2013;**338**:229-38.
- (13)Zang C, Eucker J, Liu H, Coordes A, Lenarz M, Possinger K, et al. Inhibition of pan-class I phosphatidyl-inositol-3-kinase by NVP-BKM120 effectively blocks proliferation and induces cell death in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2014;**55**:425-34.
- (14)Bendell JC, Rodon J, Burris HA, de JM, Verweij J, Birlle D, et al. Phase I, dose-escalation study of BKM120, an oral pan-Class I PI3K inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 2012;**30**:282-90.
- (15)Fasolo A, Sessa C. Targeting mTOR pathways in human malignancies. *Curr Pharm Des* 2012;**18**:2766-77.
- (16)Weniger MA, Wiestner A. Molecular targeted approaches in mantle cell lymphoma. *Semin Hematol* 2011;**48**:214-26.
- (17)O'Reilly KE, Rojo F, She QB, Solit D, Mills GB, Smith D, et al. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res* 2006;**66**:1500-8.
- (18)Rosich L, Xargay-Torrent S, Lopez-Guerra M, Campo E, Colomer D, Roue G. Counteracting autophagy overcomes resistance to everolimus in mantle cell lymphoma. *Clin Cancer Res* 2012;**18**:5278-89.
- (19)Bhatt AP, Bhende PM, Sin SH, Roy D, Dittmer DP, Damania B. Dual inhibition of PI3K and mTOR inhibits autocrine and paracrine proliferative loops in PI3K/Akt/mTOR-addicted lymphomas. *Blood* 2010;**115**:4455-63.
- (20)Maira SM, Stauffer F, Brueggen J, Furet P, Schnell C, Fritsch C, et al. Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity. *Mol Cancer Ther* 2008;**7**:1851-63.
- (21)Bhende PM, Park SI, Lim MS, Dittmer DP, Damania B. The dual PI3K/mTOR inhibitor, NVP-BEZ235, is efficacious against follicular lymphoma. *Leukemia* 2010;**24**:1781-4.
- (22)Shortt J, Martin BP, Newbold A, Hannan KM, Devlin JR, Baker AJ, et al. Combined inhibition of PI3K-related DNA damage response kinases and mTORC1 induces apoptosis in MYC-driven B-cell lymphomas. *Blood* 2013;**121**:2964-74.
- (23)Chiarini F, Grimaldi C, Ricci F, Tazzari PL, Evangelisti C, Ognibene A, et al. Activity of the novel dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor NVP-BEZ235 against T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 2010;**70**:8097-107.

- (24)Muller A, Zang C, Chumduri C, Dorken B, Daniel PT, Scholz CW. Concurrent inhibition of PI3K and mTORC1/mTORC2 overcomes resistance to rapamycin induced apoptosis by down-regulation of Mcl-1 in mantle cell lymphoma. *Int J Cancer* 2013;**133**:1813-24.
- (25)Civallero M, Cosenza M, Marcheselli L, Pozzi S, Sacchi S. NVP-BEZ235 alone and in combination in mantle cell lymphoma: an effective therapeutic strategy. *Expert Opin Investig Drugs* 2012;**21**:1597-606.
- (26)Kim A, Park S, Lee JE, Jang WS, Lee SJ, Kang HJ, et al. The dual PI3K and mTOR inhibitor NVP-BEZ235 exhibits anti-proliferative activity and overcomes bortezomib resistance in mantle cell lymphoma cells. *Leuk Res* 2012;**36**:912-20.
- (27)Bea S, Valdes-Mas R, Navarro A, Salaverria I, Martin-Garcia D, Jares P, et al. Landscape of somatic mutations and clonal evolution in mantle cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;**110**:18250-5.
- (28)Vainchenker W, Constantinescu SN. JAK/STAT signaling in hematological malignancies. *Oncogene* 2013;**32**:2601-13.
- (29)Renner C, Zinzani PL, Gressin R, Klingbiel D, Dietrich PY, Hitz F, et al. A multicenter phase II trial (SAKK 36/06) of single-agent everolimus (RAD001) in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *Haematologica* 2012;**97**:1085-91.
- (30)Hess G, Herbrecht R, Romaguera J, Verhoef G, Crump M, Gisselbrecht C, et al. Phase III study to evaluate temsirolimus compared with investigator's choice therapy for the treatment of relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2009;**27**:3822-9.
- (31)Smith SM, van BK, Karrison T, Dancey J, McLaughlin P, Younes A, et al. Temsirolimus has activity in non-mantle cell non-Hodgkin's lymphoma subtypes: The University of Chicago phase II consortium. *J Clin Oncol* 2010;**28**:4740-6.
- (32)Ansell SM, Tang H, Kurtin PJ, Koenig PA, Inwards DJ, Shah K, et al. Temsirolimus and rituximab in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma: a phase 2 study. *Lancet Oncol* 2011;**12**:361-8.
- (33)Witzig TE, Reeder CB, LaPlant BR, Gupta M, Johnston PB, Micallef IN, et al. A phase II trial of the oral mTOR inhibitor everolimus in relapsed aggressive lymphoma. *Leukemia* 2011;**25**:341-7.
- (34)Vogt PK, Hart JR. PI3K and STAT3: a new alliance. *Cancer Discov* 2011;**1**:481-6.
- (35)Burger JA, Gribben JG. The microenvironment in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and other B cell malignancies: Insight into disease biology and new targeted therapies. *Semin Cancer Biol* 2014;**24**:71-81.
- (36)Baran-Marszak F, Boukhiar M, Harel S, Laguillier C, Roger C, Gressin R, et al. Constitutive and B-cell receptor-induced activation of STAT3 are important signaling pathways targeted by bortezomib in leukemic mantle cell lymphoma. *Haematologica* 2010;**95**:1865-72.

- (37)Zhang L, Yang J, Qian J, Li H, Romaguera JE, Kwak LW, et al. Role of the microenvironment in mantle cell lymphoma: IL-6 is an important survival factor for the tumor cells. *Blood* 2012;**120**:3783-92.
- (38)Roecklein BA, Torok-Storb B. Functionally distinct human marrow stromal cell lines immortalized by transduction with the human papilloma virus E6/E7 genes. *Blood* 1995;**85**:997-1005.
- (39)Nakao T, Kim S, Ohta K, Kawano H, Hino M, Miura K, et al. Role of mitogen-activated protein kinase family in serum-induced leukaemia inhibitory factor and interleukin-6 secretion by bone marrow stromal cells. *Br J Pharmacol* 2002;**136**:975-84.
- (40)Calvo KR, Dabir B, Kovach A, Devor C, Bandle R, Bond A, et al. IL-4 protein expression and basal activation of Erk in vivo in follicular lymphoma. *Blood* 2008;**112**:3818-26.
- (41)Castillo R, Mascarenhas J, Telford W, Chadburn A, Friedman SM, Schattner EJ. Proliferative response of mantle cell lymphoma cells stimulated by CD40 ligation and IL-4. *Leukemia* 2000;**14**:292-8.
- (42)Natoli A, Lupertz R, Merz C, Muller WW, Kohler R, Krammer PH, et al. Targeting the IL-4/IL-13 signaling pathway sensitizes Hodgkin lymphoma cells to chemotherapeutic drugs. *Int J Cancer* 2013;**133**:1945-54.
- (43)Wang L, Zhao Y, Qian J, Sun L, Lu Y, Li H, et al. Toll-like receptor-4 signaling in mantle cell lymphoma: effects on tumor growth and immune evasion. *Cancer* 2013;**119**:782-91.
- (44)Chang BY, Francesco M, De Rooij MF, Magadala P, Steggerda SM, Huang MM, et al. Egress of CD19(+)/CD5(+) cells into peripheral blood following treatment with the Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib in mantle cell lymphoma patients. *Blood* 2013;**122**:2412-24.
- (45)Xargay-Torrent S, Lopez-Guerra M, Montraveta A, Saborit-Villarroya I, Rosich L, Navarro A, et al. Sorafenib inhibits cell migration and stroma-mediated bortezomib resistance by interfering B-cell receptor signaling and protein translation in mantle cell lymphoma. *Clin Cancer Res* 2013;**19**:586-97.
- (46)Ruan J, Hajjar K, Rafii S, Leonard JP. Angiogenesis and antiangiogenic therapy in non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 2009;**20**:413-24.
- (47)Fruchon S, Kheirallah S, Al ST, Ysebaert L, Laurent C, Leseux L, et al. Involvement of the Syk-mTOR pathway in follicular lymphoma cell invasion and angiogenesis. *Leukemia* 2012;**26**:795-805.
- (48)Valdembri D, Serini G, Vacca A, Ribatti D, Bussolino F. In vivo activation of JAK2/STAT-3 pathway during angiogenesis induced by GM-CSF. *FASEB J* 2002;**16**:225-7.

Table 1.- Characteristics of MCL patients

Patient n ^o .	Source	Disease status	Morphologic variant	% of tumor cells ¹	<i>PTEN</i> ²	<i>PIK3CA</i> ²	<i>AKT1</i> ²	<i>SOX11</i> ³	<i>TP53</i> ²	% cytotoxicity to everolimus (5µM, 48h)	% cytotoxicity to NVP-BKM120 (1µM, 48h)	% cytotoxicity to NVP-BE2235 (1µM, 48h)
1	PB	Diagnosis	Classical	95	ND	ND	ND	ND	ND	10.74	36.54	43.26
2	PB	Diagnosis	Classical	92	WT	Gain	WT	pos	WT	23	37.55	70.86
3	PB	Diagnosis	Classical	88	WT	Gain	WT	pos	mut/upd	40.31	33.3	68.96
4	PB	Diagnosis	Classical	92	WT	WT	WT	pos	WT	41.61	55.54	54.21
5	PB	Diagnosis	Classical	94	WT	WT	WT	pos	WT	10.51	6.59	12.17
6	PB	Diagnosis	Classical	80	ND	ND	ND	pos	ND	0	31.28	31.19
7	PB	Diagnosis	Classical	93	ND	ND	ND	pos	ND	10.76	16.31	42.61
8	PB	Diagnosis	Classical	93	WT	Gain	WT	pos	WT	28.44	30.38	31.59
9	PB	Progression	Classical	89	WT	Gain	WT	neg	mut/upd	58.42	61.26	59.21
10	PB	Diagnosis	Classical	96	WT	WT	WT	neg	mut/upd	13.33	35.57	27.77
11	PB	Diagnosis	Classical	97	WT	WT	WT	neg	WT	13.07	6.96	6.94

Abbreviations: PB: peripheral blood; ND: not determined; pos: positive; neg: negative; WT: wild type; UPD: uniparental disomy; del: deletion; mut: mutation

¹ CD19+, CD5+ cells were analyzed by flow cytometry

² detected by SNP arrays.³²

³ assessed by real time PCR

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Cytotoxic effect of everolimus, NVP-BEZ235 and NVP-BKM120 and PI3K/Akt/mTOR signaling inhibition in primary MCL cells. **A**, Primary MCL cells were treated with 5 μ M everolimus, 1 μ M NVP-BEZ235 or 1 μ M NVP-BKM120 for 48 hours and cytotoxicity was measured by Annexin V labeling. Mean \pm SEM of all the samples analyzed (n=11). **B**, Primary MCL cells (n=9) were cocultured with or without HS-5 and incubated with the corresponding drugs as above. Cell viability was assessed by Annexin V labeling at 48 hours and calculated relative to the respective untreated control, with or without stroma. Mean \pm SEM of the cases analyzed. **C**, MCL cells were exposed for 8 hours to the corresponding drugs as previously. Analysis of phosphorylated and total levels of Akt, RPS6, 4EBP1 and EIF4E were determined by Western blot. Ratio between phosphorylated and total protein levels was calculated and relative protein quantification in treated versus control extracts was conducted with Image Gauge software (Fujifilm). α -tubulin was probed as a loading control. A representative case is shown (MCL n^o.1). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ns, not significant.

Figure 2. Gene expression profile analysis of primary MCL cells treated with everolimus, NVP-BEZ235 or NVP-BKM120. **A**, Graph depicting the number of differentially expressed genes from each treatment compared to the control of the two MCL cases, with an absolute fold change > 1.5 . **B**, Heatmap illustrating the 619 exclusively expressed genes modulated by NVP-BEZ235 clustered according to unsupervised hierarchical clustering analysis. Samples with similar patterns of expression of the genes studied cluster together, as indicated by the dendrogram. Red indicates increased expression and blue decreased expression relative to the median expression level according to the color scale shown. A representative case is shown (MCL n^o.2). **C**, Gene signatures specifically downregulated by NVP-BEZ235 were obtained with GSEA. Bars represent NES (NES < -1.7). FDR < 0.05 was considered significant.

Figure 3. NVP-BEZ235 disrupts IL4 and IL6 signaling. **A**, Primary MCL cells were exposed to 5 μ M everolimus, 1 μ M NVP-BEZ235 and 1 μ M NVP-BKM120 for 8 hours

and mRNA levels of the selected genes were examined by qRT-PCR. Relative mRNA expression levels were referred to untreated controls. Bars represent the mean \pm SEM of all the samples tested (n=10). **B**, MCL cells were simultaneously incubated with IL4 (20 ng/mL) and the corresponding drugs (5 μ M everolimus, 1 μ M NVP-BEZ235 or 1 μ M NVP-BKM120). Cell viability was determined at 48 hours by Annexin V labeling and represented relative to the respective untreated control, with or without IL4. Mean \pm SEM of the cases analyzed (n=8). **C**, Western blot analysis of phosphorylated and total levels of STAT3 and STAT6 was performed after 30 minutes of simultaneous exposure of IL4 and the corresponding drugs. β -actin was probed as a loading control. A representative case is shown (MCL n^o.1). Ratio between phosphorylated and total protein levels was calculated with Image Gauge software (Fujifilm). **D-E**, MCL cells were incubated with IL6 (40 ng/mL) and the respective drugs, and cell viability and Western blot analysis of phosphorylated and total STAT3 of a representative case (MCL n^o.1) were determined as above. Phospho-STAT3/STAT3 ratio was calculated as previously. Mean \pm SEM of the cases analyzed (n=7). β -actin was probed as a loading control. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ns, not significant.

Figure 4. PI3K/Akt/mTOR inhibitors effect on CXCL12-induced MCL cell migration and invasion. **A**, Primary MCL cells were preincubated with 5 μ M everolimus, 1 μ M NVP-BEZ235 or 1 μ M NVP-BKM120 for 1 hour before CXCL12 (200 ng/mL) addition. Polymerized actin content was determined at the indicated time points after CXCL12 addition. Results are displayed relative to the samples (n=7) before chemokine stimulation (100 %). Bars represent the mean \pm SEM. **B**, MCL samples (n=7) were assayed for chemotaxis toward CXCL12 after 1 hour of preincubation with the drugs. Relative number of migrating cells to the untreated control without CXCL12 is represented. Bars correspond to the mean \pm SEM. **C**, Samples (n=7) were assayed for invasion toward CXCL12 through matrigel invasion chambers. Invasion is represented as the ratio between invasive cells and input viable cells, relative to the untreated control. Bars correspond to the mean \pm SEM. *, $P < 0.05$.

Figure 5. NVP-BEZ235 downregulates angiogenesis in MCL cells. **A**, Supernatants from MCL cells were harvested after 8 hours of incubation with drugs and added to HUVEC

cells for 24h. The number of branch points was quantified as the mean of 5 randomly chosen fields from each well, as relative to the untreated control. Bars represent the mean \pm SEM of 6 MCL cases. Microscope images (x40 magnification) from a representative case are shown (MCL n^o.7). *, $P < 0.05$.

Figure 1

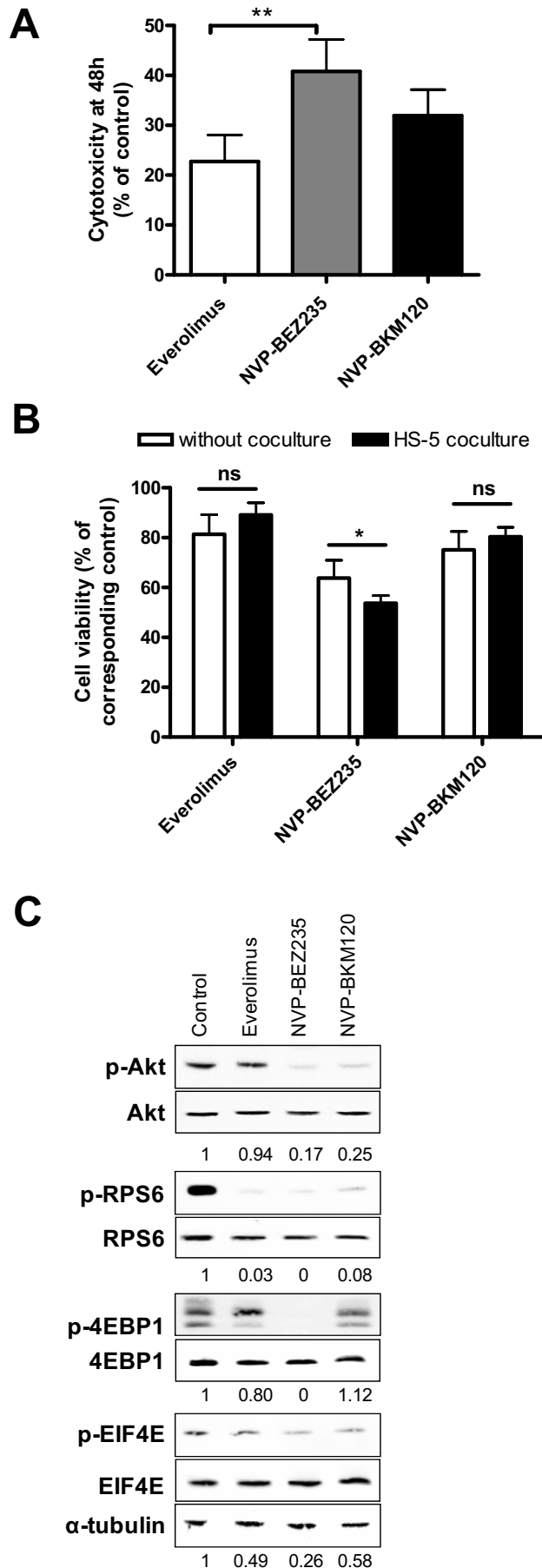
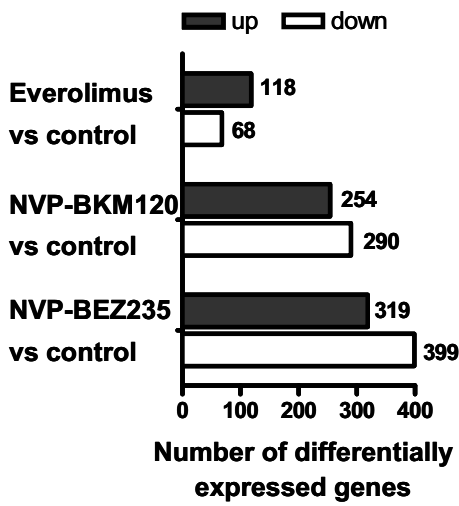
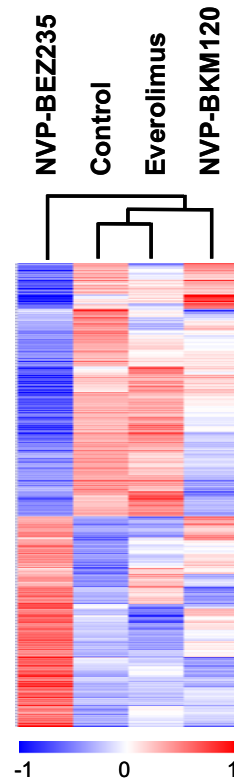


Figure 2

A



B



C

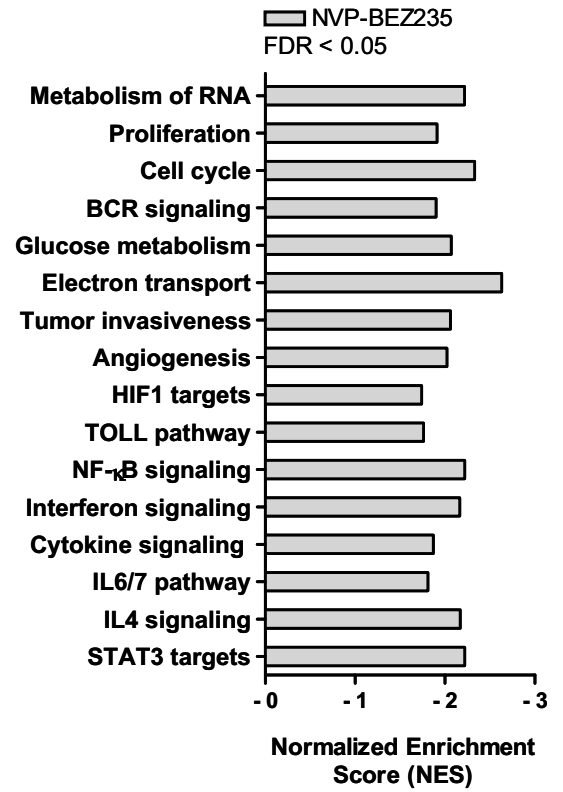
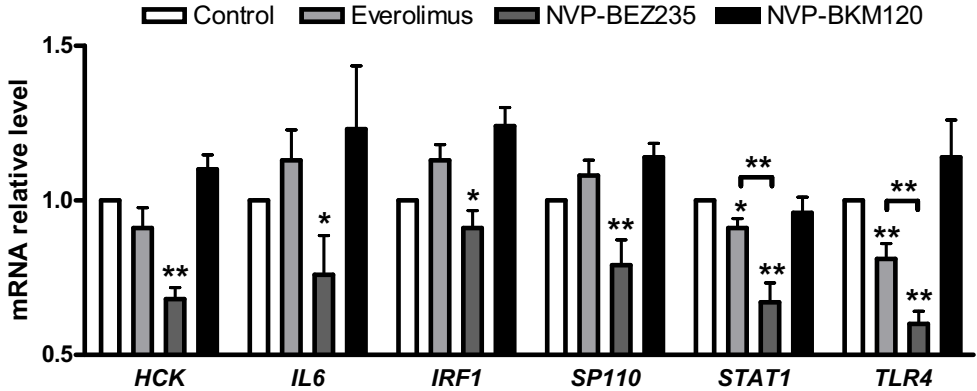
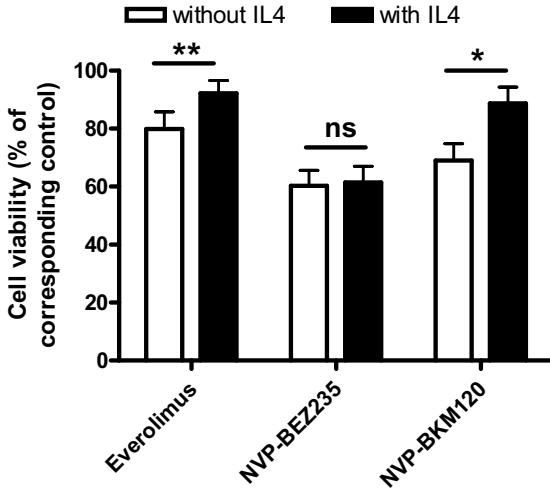


Figure 3

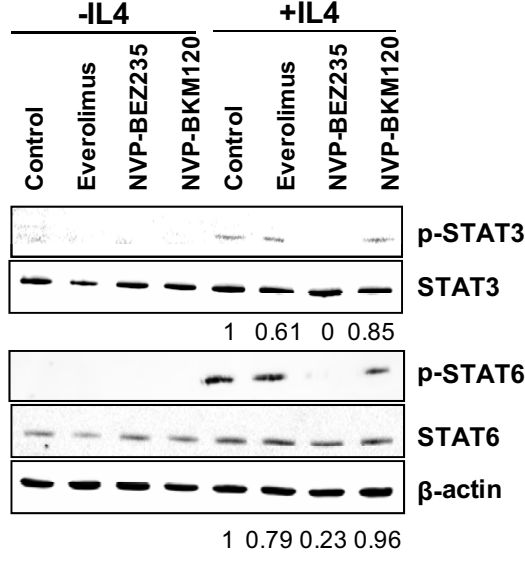
A



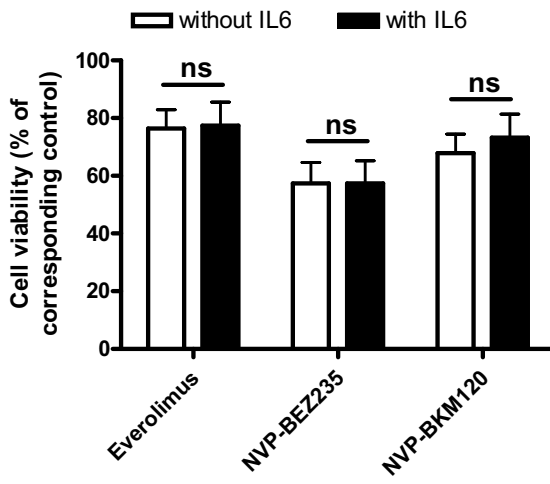
B



C



D



E

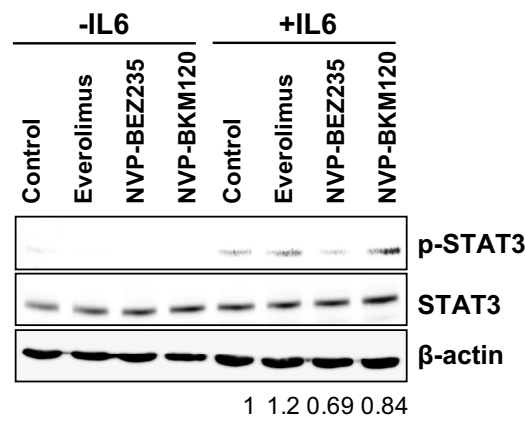
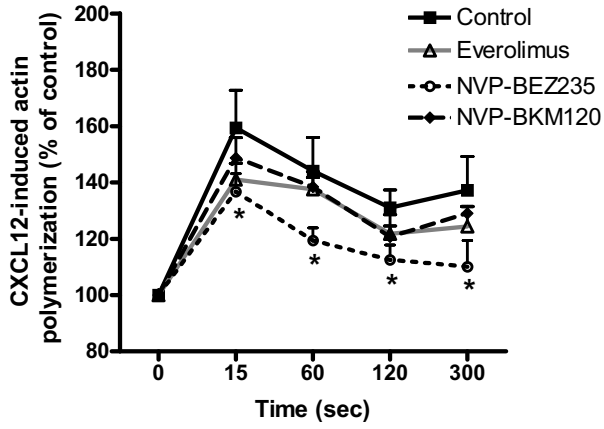
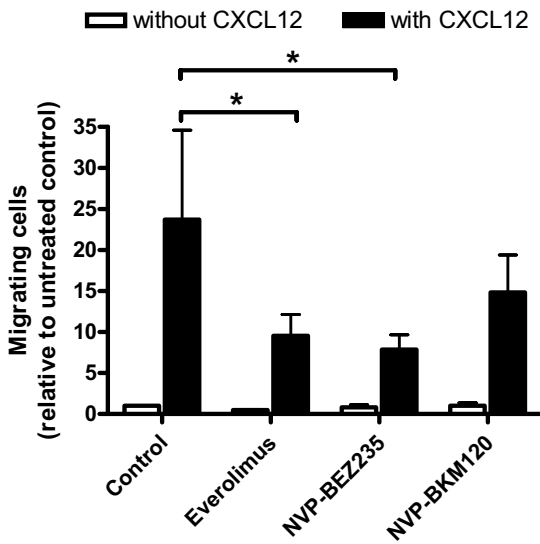


Figure 4

A



B



C

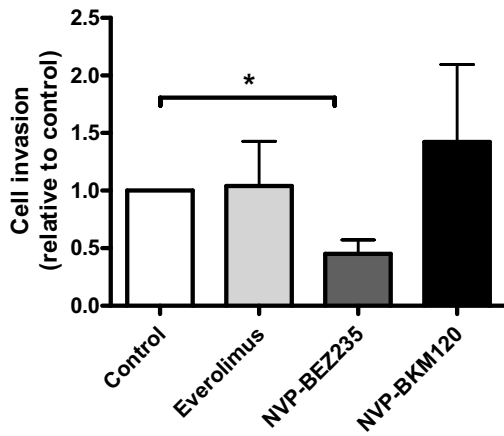
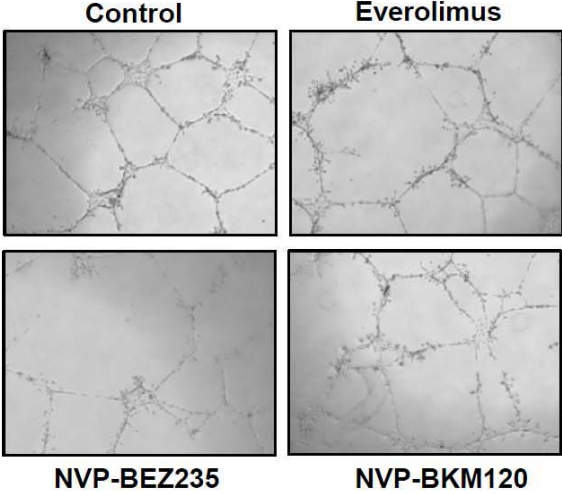
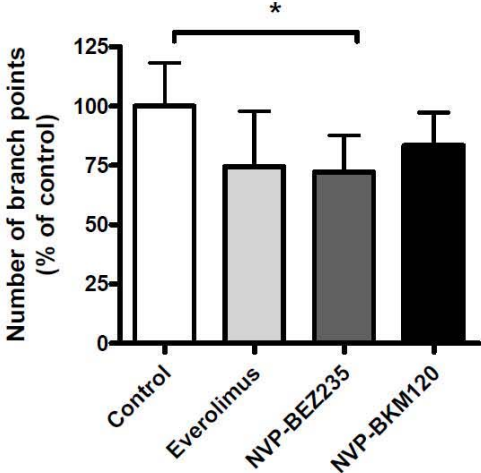


Figure 5

A



Supplementary information

Table S1. Validation of gene expression profiling by RT-PCR

Gene	Gene sets	mRNA level (relative to control)		
		Everolimus	NVP-BEZ235	NVP-BKM120
<i>HCK</i>	IL6/7 pathway, cytokine signaling	0.91 ± 0.21	0.68 ± 0.12	1.10 ± 0.15
<i>IL6</i>	IL4 signaling, IL6/7 pathway, cytokine signaling	1.13 ± 0.31	0.76 ± 0.40	1.23 ± 0.65
<i>IRF1</i>	IL6/7 pathway, interferon signaling, cytokine signaling	1.13 ± 0.16	0.91 ± 0.18	1.24 ± 0.19
<i>SP110</i>	STAT3 targets	1.08 ± 0.16	0.79 ± 0.26	1.14 ± 0.14
<i>STAT1</i>	STAT3 targets, IL6/7 pathway, tumor invasiveness, interferon signaling, cytokine signaling	0.91 ± 0.1	0.67 ± 0.20	0.96 ± 0.16
<i>TLR4</i>	TOLL pathway	0.81 ± 0.16	0.60 ± 0.13	1.14 ± 0.38
<i>BCL2L1</i>	IL6/7 pathway	1.09 ± 0.16	0.9 ± 0.2	1.07 ± 0.14
<i>CD69</i>	IL4 signaling	1.15 ± 0.19	1.16 ± 0.38	1.16 ± 0.16
<i>MYD88</i>	TOLL pathway, cytokine signaling	0.99 ± 0.11	1 ± 0.18	1.08 ± 0.12
<i>PPP2CA</i>	IL4 signaling, metabolism of RNA, glucose metabolism	0.97 ± 0.07	1.09 ± 0.21	1.07 ± 0.12
<i>TLR2</i>	TOLL pathway	1 ± 0.35	1.04 ± 0.49	1 ± 0.32

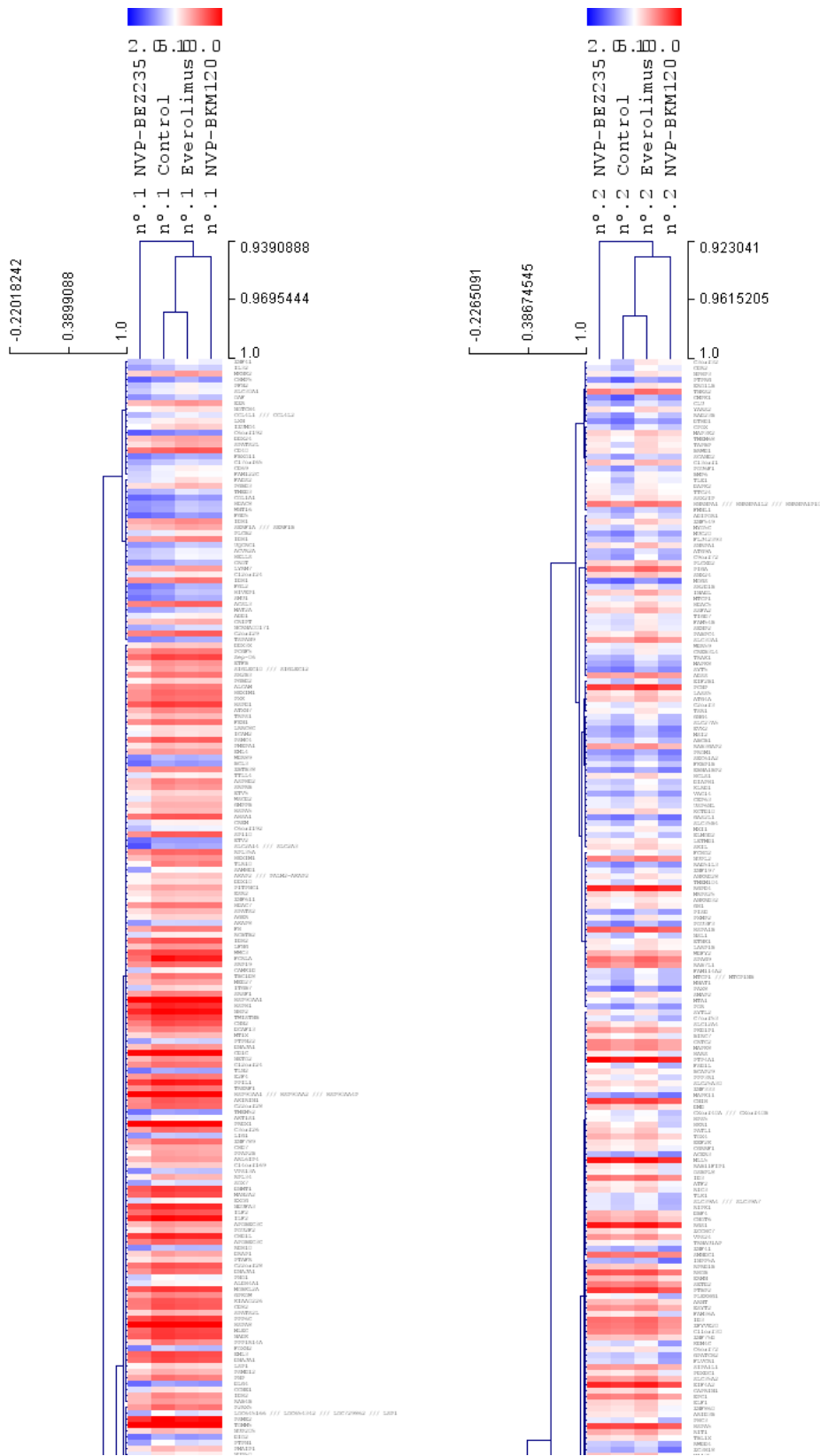
Gene signatures were obtained from GSEA, from the Molecular Signature Database v2.5
Statistically significant results are indicated in bold

Table S2. Gene sets significantly downregulated in NVP-BEZ235-treated samples vs control MCL cells

Gene sets (C2all)	Gene set size	Everolimus		NVP-BEZ235		NVP-BKM120	
		NES	FDR	NES	FDR	NES	FDR
DAUER_STAT3_TARGETS_DN	49	-1.219	0.415	-2.220	2.46E-05	1.430	0.185
LU_IL4_SIGNALING	89	1.133	0.530	-2.170	4.20E-05	1.387	0.209
PID_IL6_7PATHWAY	47	1.131	0.530	-1.810	0.009	1.134	0.421
REACTOME_CYTOKINE_SIGNALING_IN_IMMUNE_SYSTEM	260	-1.003	0.702	-1.870	<1E-05	1.129	0.427
REACTOME_INTERFERON_SIGNALING	151	-1.380	0.258	-2.163	5.09E-05	-1.223	0.349
REACTOME_ACTIVATION_OF_NF_KAPPAB_IN_B_CELLS	61	-0.811	0.916	-2.220	2.43E-05	-1.622	0.064
BIOCARTA_TOLL_PATHWAY	37	-0.972	0.742	-1.760	0.013	-1.007	0.633
SEMENZA_HIF1_TARGETS	34	-1.312	0.314	-1.740	0.016	-1.609	0.068
HU_ANGIOGENESIS_DN	37	0.815	0.933	-2.020	8.05E-04	0.810	0.875
REACTOME_RESPIRATORY_ELECTRON_TRANSPORT	65	-1.752	0.067	-2.630	<1E-05	-1.121	0.464
REACTOME_GLUCOSE_METABOLISM	64	-1.423	0.228	-2.070	3.32E-04	-1.473	0.138
REACTOME_SIGNALING_BY_THE_B_CELL_RECEPTOR_BCR	121	-0.988	0.720	-1.900	<1E-05	-1.578	0.081
REACTOME_REGULATION_OF_MITOTIC_CELL_CYCLE	76	-1.744	0.070	-2.330	<1E-05	-1.649	0.054
BENPORATH_PROLIFERATION	138	-1.216	0.416	-1.910	<1E-05	-1.330	0.241
WANG_TUMOR_INVASIVENESS_UP	364	0.866	0.896	-2.060	3.85E-04	-1.521	0.110
REACTOME_METABOLISM_OF_RNA	249	0.717	0.980	-2.216	2.41E-05	-1.626	0.062

NES, Normalized Enriched Score; FDR, False Discovery Rate
C2all motif gene signatures were obtained from the Molecular Signature Database v2.5

Figure S1





Discussió

L'axis PI3K/AKT/mTOR està constitutivament activat en la majoria de limfomes de cèl·lula B.¹⁹² En aquestes neoplàsies, l'activació de la via pot ser principalment deguda a la pèrdua de PTEN o a la sobreexpressió de *PIK3CA*, els quals es troben entre els gens supressors de tumors i els oncogens, respectivament, més freqüentment mutats en els tumors humans. Fins i tot quan una cèl·lula cancerosa presenta una expressió normal d'aquests gens, altres lesions poden activar aquesta via de senyalització.¹⁴⁹

La via de PI3K/AKT/mTOR està involucrada en la regulació de funcions cel·lulars essencials, i per la seva participació en la complexa xarxa de comunicació amb el microambient, és crítica per la progressió tumoral i la resistència a fàrmacs neoplàsics. Gràcies a la major comprensió de la complexitat de la via i del seu rol en la tumorigènesi, aquesta via s'ha establert com una atractiva diana terapèutica en oncologia. Molts han estat els esforços que fins ara s'han dedicat al desenvolupament d'inhibidors de cinases essencials en la transducció de senyals.¹⁴⁸ En aquesta tesi, hem estudiat diferents estratègies terapèutiques per inhibir la via de PI3K/AKT/mTOR en dues neoplàsies de cèl·lula B, el MCL i la CLL.

1. La inhibició de PI3K mitjançant NVP-BKM120

El nostre estudi estableix que NVP-BKM120 inhibeix efectivament la senyalització de PI3K i que interfereix en l'efecte protector del microambient amb la subseqüent inducció de l'apoptosi en les cèl·lules de CLL. Els nostres resultats proporcionen una visió del mecanisme d'acció de NVP-BKM120 en la CLL, suggerint que la inducció de BIM és un factor clau en la citotoxicitat de NVP-BKM120. A més, NVP-BKM120 inhibeix la migració i la polimerització d'actina de les cèl·lules de CLL, el que pot ser particularment important per la mobilització de les cèl·lules tumorals i la sensibilització a la quimioteràpia. Finalment, considerem que NVP-BKM120 podria ser una estratègia terapèutica atractiva tant com a monoteràpia com en combinació en la CLL.

1.1. Mecanisme d'acció de NVP-BKM120

Els nostres resultats indiquen que NVP-BKM120 indueix apoptosi en les cèl·lules de CLL de forma selectiva per les cèl·lules tumorals. Aquesta citotoxicitat succeeix de forma independent de la majoria dels marcadors pronòstics, com l'estat mutacional de les *IGHV*, l'expressió de ZAP70 i CD38, alteracions citogenètiques adverses i les noves mutacions recurrents recentment descrites en la CLL.⁸⁰ De manera que NVP-BKM120 podria ser una teràpia efectiva també en aquells casos de CLL amb pitjor pronòstic.

La inhibició de PI3K per NVP-BKM120 condueix a la desfosforilació d'AKT i a la subseqüent regulació d'un gran nombre de proteïnes entre les quals es troba FOXO3A. La subfamília de gens supressors de tumors *FOXO* són efectors crítics situats sota d'AKT en la cascada de senyalització cel·lular.³³² L'activació de FOXO3A, per la reducció de la seva fosforilació i per l'increment del seu contingut al nucli, augmenta l'expressió de gens que estan involucrats tant en l'apoptosi com en la parada del cicle cel·lular.^{333;334} FOXO3A és un important regulador de l'expressió de BIM,³³⁵ de manera que les alteracions en l'eix AKT-FOXO3A s'ha descrit que n'afecten l'expressió en diferents models.^{336;337} Recentment, s'ha descobert que la sobreexpressió de FOXO3A en cèl·lules de la CLL és capaç de reduir la seva supervivència i d'induir l'expressió de BIM i p27.³³⁸ D'acord amb aquesta troballa, hem observat que NVP-BKM120 és capaç d'induir BIM en les cèl·lules de la CLL, fins i tot després de l'estimulació del BCR o el cocultiu amb cèl·lules estromals. A més a més, hem demostrat que la inducció de BIM és funcionalment important per l'apoptosi induïda per NVP-BKM120, ja que el silenciament gènic de *BIM* prova que aquesta *BH3-only* efectivament contribueix a la mort cel·lular després del tractament amb NVP-BKM120. La implicació de BIM en la inducció de l'apoptosi en la CLL també s'ha descrit amb altres agents que no són inhibidors de la via de PI3K, com ara els glucocorticoids^{339;340} o la forodesina.³⁴¹

BIM dimeritza preferencialment amb MCL1, una diana clau per la supervivència de les cèl·lules tumorals. L'elevada expressió de MCL1 i una baixa ràtio BIM/MCL1 són predictors de mala resposta als agents quimioterapèutics.^{276;341} Els nostres resultats

mostren que MCL1 és induït tant en cèl·lules amb estimulació del BCR com en el cocultiu amb cèl·lules estromals, per tant, juga un rol important en la senyalització derivada del microambient. En aquest context, s'ha descrit que les cèl·lules tumorals del moll de l'os responen menys al BH3-mimètic ABT-263, que pot ser degut a l'augment de MCL1 en cèl·lules de CLL en contacte amb l'estroma i a una disminució de l'expressió de BIM.^{342;343} A més, s'ha descrit que la presència de polimorfismes de *BIM*, en els quals manca el domini proapoptòtic, confereix resistència als inhibidors de tirosina cinases i que la combinació amb BH3-mimètics en restableix la sensibilitat.³⁴⁴ En el nostre estudi, la inducció de BIM per NVP-BKM120 podria ser capaç de neutralitzar l'expressió de MCL1, i ja que NVP-BKM120 també inhibeix la traducció de MCL1, s'accentuaria encara més la ràtio BIM/MCL1, conduint a l'activació de la via apoptòtica mitocondrial.

1.2. NVP-BKM120 i els seus efectes en el microambient tumoral

El nostre treball suggereix que l'efecte citotòxic de NVP-BKM120 és degut tant a la inhibició directa de la senyalització de PI3K, com a la pertorbació del suport que exerceixen els factors del microambient en les cèl·lules tumorals. Específicament, hem observat que NVP-BKM120 és capaç d'induir citotoxicitat malgrat l'estimulació del BCR en les cèl·lules de la CLL. L'estimulació del BCR també provoca la secreció de les quimiocines CCL3 i CCL4, que actuen com a atractants dels limfòcits T.¹⁰⁵ Els nostres resultats mostren que NVP-BKM120 bloqueja eficientment la síntesi d'aquestes quimiocines.

Les cèl·lules estromals del microambient són un altre factor fonamental que contribueix a la proliferació tumoral i a la resistència a fàrmacs.³⁴⁵ Els nostres resultats mostren que NVP-BKM120 sensibilitza les cèl·lules de CLL a fludarabina i bendamustina, dos fàrmacs citotòxics utilitzats habitualment per al tractament de la CLL, fins i tot en la presència de cèl·lules estromals. NVP-BKM120 també inhibeix la senyalització induïda per CXCL12 i la migració de les cèl·lules de la CLL. A més a més, aquest compost també és efectiu en cèl·lules del gangli limfàtic i del moll de l'os. Per tant, les nostres dades suggereixen que NVP-BKM120 podria induir citotoxicitat en les

cèl·lules de la CLL en aquests compartiments a través de la privació del teixit microambiental de suport, interferint en la retenció de les cèl·lules tumorals en els teixits limfàtics.

En aquesta línia, les respostes clíniques de l'inhibidor de PI3K δ ,^{120;177} així com dels inhibidors d'altres cinases del BCR, com SYK i BTK,^{118;142} mostren una ràpida mobilització de les cèl·lules tumorals des de les masses nodals cap a la circulació perifèrica, amb una significativa disminució de les limfadenopaties i l'esplenomegàlia, i un increment transitori en el nombre de limfòcits en sang perifèrica. Aquest increment de cèl·lules tumorals circulants pot ser ràpid i mantenir-se varis mesos fins que es resol, motiu pel qual, si s'aplica rigorosament el criteri de resposta al tractament de IWCLL (*International Workshop on CLL*),⁶⁴ aquests pacients podrien complir el criteri de progressió de la malaltia, fins i tot a pesar de la millora en la limfadenopatia i l'esplenomegàlia. Per tant, es fa necessari reajustar el criteri tradicional de resposta amb aquests nous tractaments, avaluant la resposta nodal malgrat la limfocitosi, per tal de no subestimar el seu benefici terapèutic.³⁴⁶

1.3. Inhibir una o totes les isoformes de PI3K?

El principal argument d'utilitzar inhibidors de totes les isoformes de PI3K, com NVP-BKM120, és que la majoria de cèl·lules canceroses expressen múltiples isoformes de PI3K amb funcions redundants en la senyalització oncogènica.³³⁰ Recentment, s'ha descrit que NVP-BKM120 és 3.6 vegades més potent que l'inhibidor de p110 δ idelalisib en cèl·lules primàries de CLL *in vitro*,¹⁸⁷ confirmant el rol crucial de les diferents isoformes de PI3K –a més a més de la isoforma δ – en la CLL. En aquest sentit, s'ha descrit que l'expressió de p110 α pot mantenir la senyalització PI3K constitutiva malgrat la inhibició de p110 δ .¹⁵⁷ Tot això posa de manifest la importància d'inhibir les diferents isoformes per tal d'antagonitzar la supervivència, la resistència als fàrmacs i per superar possibles funcions redundants.¹⁸⁸ D'altra banda, el contrapunt d'aquests inhibidors està associat amb la possible toxicitat i els efectes no específics del bloqueig de PI3K en d'altres membres de la mateixa família de cinases (*PI3K-related kinase family*), com ara mTOR o ATM. Caldrà veure si els nous inhibidors selectius de

determinades isoformes de PI3K, com la inhibició doble de p110 α i p110 δ , superen els mecanismes de resistència i obtenen una bona tolerabilitat pel pacient.

2. La inhibició de mTOR mitjançant everolimus

En el segon estudi, hem utilitzat un extens panell de línies cel·lulars de MCL i hem confirmat l'activitat antiproliferativa d'everolimus, mitjançant la parada del cicle cel·lular en fase G₁ en línies cel·lulars de MCL.³⁴⁷ Per primera vegada, mostrem com aquest agent indueix citotoxicitat dosi-depenent i selectiva en la majoria de casos primaris de MCL analitzats, en el rang de dosis adequat *in vivo*. Com esperàvem, everolimus inhibeix eficientment l'activitat de mTOR en les línies i mostres primàries sensibles a un temps curt de tractament, com ho demostra la disminució dels nivells de fosforilació de les dianes de mTOR, S6RP i 4EBP1, i una reducció transitòria de la fosforilació d'AKT (Ser473). Una prolongada inactivació de mTORC1, però, desencadena una refosforilació d'AKT,²²⁸ un fenomen descrit com un determinant crucial de la resposta de les cèl·lules tumorals als derivats de la rapamicina.^{228;348} Donat que aquesta tardana reactivació pot contrarestar l'activitat d'everolimus, descrivim que la combinació del rapalog amb un inhibidor isoselectiu d'AKT exerceix una activitat antitumoral sinèrgica en totes les mostres analitzades, especialment en aquells casos amb elevada sensibilitat a everolimus. En aquestes cèl·lules, demostrem que l'efecte sinèrgic de la combinació és mitjançant l'activació de l'apoptosi.

Malgrat tot, hem observat que les mostres de MCL que responen poc a everolimus mantenen un elevat nivell de viabilitat malgrat la inhibició completa de l'eix AKT/mTOR, de forma similar a observacions prèvies en el limfoma fol·licular.²⁴⁰ Entre els mecanismes de resistència que poden participar en la manca d'apoptosi, diferents evidències suggereixen que l'autofàgia és un dels principals processos involucrats funcionalment en la supervivència de les cèl·lules canceroses després de l'exposició a inhibidors d'AKT i mTOR.³²⁰ En la leucèmia mieloide aguda, la inhibició de mTOR condueix a la inducció de l'autofàgia, tot contrarestant l'efecte d'aquests agents.³⁴⁹ En línies de MCL, temsirolimus ha mostrat activar el procés autofàgic, encara que la

contribució d'aquest fenomen a l'activitat de l'inhibidor de mTOR no ha estat discutida de forma clara.³²⁴

Els nostres resultats mostren que dues característiques bàsiques de l'autofàgia, el processament de LC3B i la formació de vacuoles autofàgiques, augmenten en les cèl·lules de MCL resistents a la combinació d'everolimus i l'inhibidor d'AKT AKTi-1/2, quan són comparats amb les cèl·lules sensibles. Encara més important, demostrem que l'autofàgia controla la resposta de les cèl·lules de MCL als inhibidors de mTOR i AKT, ja que tant el tractament amb inhibidors de l'autofàgia com el silenciament gènic d'ATG3, ATG5 i ATG7, proteïnes requerides per la progressió de l'autofàgia, permet que les cèl·lules de MCL entrin en apoptosi després de l'exposició a la combinació. En aquesta línia, s'ha descrit que els inhibidors duals PI3K/mTOR poden induir autofàgia com a senyal central de supervivència,³⁵⁰ destacant que una mort cel·lular efectiva en cèl·lules malignes amb activació constitutiva d'AKT requereix del bloqueig de les tres dianes descrites en aquest article: mTOR, AKT i l'autofàgia.

En resum, els nostres resultats mostren per primera vegada que l'ús d'un inhibidor de l'autofàgia pot superar la resistència a la combinació d'everolimus i un inhibidor d'AKT isoselectiu en línies cel·lulars i mostres primàries de MCL. El rol de prosupervivència proposat per l'autofàgia en cèl·lules resistents a la inhibició d'AKT i mTOR posa en rellevància diferents possibilitats potencials pel desenvolupament clínic d'aquesta estratègia combinada.

2.1. Inhibir una única diana o més d'una en la via de PI3K/AKT/mTOR?

Tot i que s'ha observat activitat antitumoral amb els inhibidors de mTOR com a monoteràpia i en combinació, només una proporció de pacients refractaris o en recaiguda responen als anàlegs de la rapamicina i la resposta sovint no és duradora.^{219;220;351;352} A més, la presència de diferents bucles retroactius poden atenuar l'efectivitat d'aquests compostos. El sinergisme observat entre els inhibidors d'AKT i mTOR pot ser degut al bloqueig del bucle compensatori que succeeix en inhibir mTOR, el qual està involucrat en la reactivació de la senyalització dels receptors cinasa,

així com el mateix AKT, tant *in vivo* com *in vitro* en diferents models humans de càncer.^{228;229}

En aquesta línia, els inhibidors duals de PI3K/mTOR sorgeixen com una bona estratègia per superar els mecanismes de resistència de la via de PI3K/AKT/mTOR, en particular per prevenir la refosforilació d'AKT, el que emfatitza el requeriment d'una inhibició completa de la via per millorar l'activitat antitumoral.

3. La inhibició de mTOR i PI3K mitjançant NVP-BEZ235

En el tercer estudi, hem comparat l'efecte d'everolimus, un inhibidor de mTORC1, NVP-BEZ235, un inhibidor dual de PI3K i mTOR (mTORC1 i mTORC2) i NVP-BKM120, un inhibidor de totes les isoformes de PI3K de classe I, en cèl·lules primàries de MCL. Hem observat que NVP-BEZ235 és més potent que everolimus o NVP-BKM120 en la inhibició de la via de senyalització de PI3K/AKT/mTOR i en la inducció de la citotoxicitat en presència de cèl·lules estromals. L'ús de l'inhibidor dual PI3K/mTOR dona suport a la idea d'inhibir la via de PI3K/AKT/mTOR en múltiples nivells per tal d'aconseguir una inducció de l'apoptosi més eficaç en presència dels senyals del microambient i una prevenció de la resistència als fàrmacs.

Basant-nos en les diferències dels efectes citotòxics de cada fàrmac, l'anàlisi del perfil d'expressió gènica revela que NVP-BEZ235 modula un elevat nombre de gens en comparació amb NVP-BKM120 i everolimus, essent l'inhibidor de mTORC1 el fàrmac que indueix el menor nombre de canvis gènics. Consistentment, les mostres tractades amb NVP-BEZ235 tenen disminucions de vies de senyalització que és sabut que estan sota el control de PI3K/AKT/mTOR.¹⁴⁹ Addicionalment, hem observat la inhibició de vies involucrades en l'angiogènesi, la invasió cel·lular i processos inflamatoris. El tractament amb NVP-BEZ235 també disminueix les vies de senyalització de les citocines IL6 i IL4, confirmant una contribució essencial de la família STAT a la via de senyalització PI3K/mTOR³⁵³ en el MCL.

Les interaccions entre les cèl·lules B neoplàstiques i les cèl·lules del microambient tumoral són crítiques per la progressió de la malaltia i la quimioresistència.^{43;345} En el MCL, l'activació constitutiva de STAT3 s'ha observat que pot ser a través de la secreció autocrina de IL6 i/o IL10 o en resposta a l'estimulació del BCR.³⁵⁴ A més, recentment s'ha descobert que l'activació de STAT3 mitjançant IL6 compromet l'efecte terapèutic de la quimioteràpia en el MCL.⁴⁶ En aquest context, hem demostrat que NVP-BEZ235 és capaç de disminuir la senyalització de STAT3 en presència de IL6, contràriament al que succeeix amb everolimus o NVP-BKM120. A més, NVP-BEZ235 també disminueix els nivells d'expressió gènica de *HCK*, *IRF1*, *SP110* i *STAT1*, tots ells gens relacionats amb la senyalització per IL6. Degut a que s'ha descrit que les cèl·lules estromals derivades del moll de l'os secreten IL6,^{354;355} hipotetitzem que l'increment de la citotoxicitat de NVP-BEZ235 en el cocultiu amb cèl·lules estromals podria ser degut a la seva habilitat per interferir amb la senyalització per citocines.

L'efecte promotor del creixement de IL4 mitjançant la fosforilació de STAT6 també ha estat descrit en limfomes de cèl·lula B.^{47;353;356;357} Les nostres dades destaquen que NVP-BEZ235 efectivament supera l'efecte prosupervivència de IL4 així com també n'inhibeix completament la seva senyalització. Addicionalment, observem que els nivells de TLR4 es troben disminuïts amb el tractament amb NVP-BEZ235. En un estudi previ es va descriure que l'activació de la senyalització de TLR4 en cèl·lules de MCL, un dels TLRs predominants en aquestes cèl·lules, induïa proliferació i secreció de citocines com IL6 i VEGF.³⁵⁸ Recentment, un estudi de seqüenciació d'exomes va detectar mutacions activadores recurrents en TLR2 que incrementaven la producció de IL6, entre d'altres quimiocines.³⁵ A més, NVP-BEZ235 va inhibir els múltiples factors de creixement secretats de forma autocrina i paracrina en limfomes addictes a la via PI3K/AKT/mTOR.²³⁹ Per tant, la nostra troballa dóna suport a la idea que el tractament amb NVP-BEZ235 pot interferir la senyalització de les citocines en MCL, la qual és crucial per mantenir l'activitat tumoral en el seu microambient.

Un event clau en el desenvolupament i la progressió del càncer és el potencial de les cèl·lules tumorals per migrar i envair teixits circumdants. En aquest context, mostrem per primera vegada que NVP-BEZ235 clarament redueix el potencial migratori i invasiu

de les cèl·lules de MCL, en línia amb la informació proporcionada pel perfil d'expressió gènica. Recentment, s'ha descrit que ibrutinib¹⁴¹ i sorafenib²⁶⁰ inhibeixen la migració de les cèl·lules de MCL i CLL, indicant el potencial dels inhibidors de cinases associades al BCR en modular la retenció de les cèl·lules tumorals en els teixits limfoides. A part dels processos de migració i invasió, l'angiogènesi sembla tenir una particular importància en la fisiopatologia dels limfomes, ja que la progressió de la malaltia s'ha trobat que correlaciona amb un augment de l'activitat angiogènica.³⁵⁹ En aquest sentit, la implicació de la via PI3K/AKT/mTOR en la invasió cel·lular i l'angiogènesi han estat proposats en el limfoma fol·licular.³⁶⁰ En aquest estudi, proporcionem la primera evidència de l'habilitat de NVP-BEZ235 per interferir en el procés angiogènic. Aquest efecte podria estar relacionat amb la observada reducció de la senyalització de STAT3, ja que s'ha demostrat la seva participació en respostes angiogèniques *in vivo*.³⁶¹

El MCL és un dels limfomes més difícils de tractar, la qual cosa és, en part, deguda a les recaigudes freqüents i a la progressiva resistència al tractament, suggerint que el microambient podria mantenir cèl·lules tumorals residuals resistents a la quimioteràpia.²⁰ Els nostres resultats plantegen l'ús de NVP-BEZ235 com a estratègia terapèutica per interferir en les interaccions entre les cèl·lules malignes i el microambient, gràcies a la seva contribució en processos essencials com l'angiogènesi, la migració, la invasió i la senyalització per citocines. Finalment, proposem que inhibir la via PI3K/AKT/mTOR per múltiples nivells pot proporcionar una activitat antitumoral més eficaç que les actuals estratègies utilitzant inhibidors de mTOR en el MCL.

4. Identificació de biomarcadors

L'avaluació de la fosforilació de RPS6, 4EBP1, AKT o PRAS40 s'ha utilitzat com a biomarcador de la senyalització cel·lular en la clínica.^{120;189;199} De fet, l'augment dels nivells d'AKT fosforilat després del tractament amb rapalogs s'ha proposat com un biomarcador de resposta a la teràpia.³⁴⁸ Malgrat tot, els assaigs clínics inicials amb aquests inhibidors no han mostrat una correlació clara entre les alteracions moleculars en la via de senyalització i l'efecte antitumoral.^{189;362} Els resultats inconclusius del valor

predictiu d'aquestes mutacions en l'eficàcia clínica dels inhibidors es podria explicar per la manca de detecció d'altres alteracions relacionades amb la via, per la coexistència de mutacions relacionades amb resistència, com ara activació de la via de les MAPK²⁶⁸ o heterogeneïtat intratumoral.²⁰⁶

Un biomarcador de resistència recentment identificat és la proteïna PAK1 (*p21-Activated Kinase 1*), involucrada en senyalització prosupervivència i prèviament descrita com un marcador de mal pronòstic en pacients amb tumors sòlids. En un estudi realitzat en línies cel·lulars de limfoma, es va observar que l'expressió de PAK1 participava en la resistència a inhibidors de PI3K i inhibidors duals PI3K/mTOR. Però encara no s'ha validat clínicament.³⁶³

En general, la manca de biomarcadors amb poder predictiu de resposta dificulta l'estratificació dels pacients i l'èxit clínic d'aquests inhibidors, especialment en monoteràpia.

5. Dianes terapèutiques alternatives emergents de la via PI3K/AKT/mTOR

Altres components associats a aquesta via de senyalització poden ser dianes d'utilitat per la teràpia anticancerosa. Basant-nos en la importància de la traducció de proteïnes per les cèl·lules canceroses, fàrmacs que inhibeixin eIF4E són força atractius.^{233;364} En aquesta mateixa línia, les cinases MNK (*MAPK-interacting kinases*), que fosforilen eIF4E,^{365;366} i PIM (*Proviral Integration site for Moloney murine leukemia virus*), que fosforilen eIF4B (*eukaryotic translation Initiation Factor 4B*) entre d'altres substrats, també promouen la síntesi de proteïnes i el seu paper com a diana terapèutica en oncologia està essent avaluat.³⁶⁷⁻³⁶⁹

6. Combinació racional de teràpies

Donat que la via de senyalització de PI3K forma part d'una complexa xarxa d'interaccions, amb cascades de senyalització paral·leles, la seva inhibició farmacològica pot donar lloc a l'activació compensatòria de diferents vies de

senyalització. Per aquest motiu, la combinació racional de diferents inhibidors és una aproximació que permet potenciar l'efecte dels diferents agents.

La combinació de teràpies generalment comença amb els fàrmacs ja aprovats per al tractament estàndard de les diferents neoplàsies. En el cas d'ibrutinib o idelalisib, per exemple, la combinació amb règims citotòxics de quimioteràpia permet resoldre més ràpidament i de forma completa la limfocitosi, aconseguint ORR més elevades¹²¹⁻¹²⁵ (Taula 4).

Taula 4 | Selecció d'estudis de combinació amb inhibidors del BCR i de la via PI3K/AKT/mTOR

Diana	Compost	Règim de combinació	Assaig clínic (fase)	N	Malaltia	ORR	Estudi
PI3K	NVP-BKM120	Rituximab	1	24	NHL indolent	En actiu	NCT02049541
PI3Kδ	Idelalisib	Rituximab	3	220	CLL	81%	¹²²
		Ofatumumab	3	270	CLL	En actiu	NCT01659021
		Bendamustina	1	15	CLL	78%	¹²³
		Clorambucil	1	18	CLL	67%	¹²³
		Fludarabina	1	12	CLL	92%	¹²³
		Bendamustina + Rituximab	1	15	CLL	87%	¹²⁵
		Clorambucil + Rituximab	1	14	CLL	93%	¹²⁵
BTK	Ibrutinib	Rituximab	2	39	CLL	95%	¹²⁴
		Bendamustina + Rituximab	1b	30	CLL	93%	³⁷⁰
		R-CHOP	1b	15	NHL CD20+	100%	¹²¹
		Lenalidomida	1	34	NHL	En actiu	NCT01955499
		Ofatumumab	3	391	CLL	En actiu	NCT01578707
AKT	MK-2206	Ridaforolimus	1	124	Càncer avançat	En actiu	NCT01295632
		Bendamustina + Rituximab	1/2	49	CLL	En actiu	NCT01369849
mTOR	Everolimus	Rituximab	1b	16	Limfomes CD20+	En actiu	³⁷¹
		Bortezomib	1	36	Limfoma	En actiu	NCT00671112
		Lenalidomida	1/2	23	Limfoma	En actiu	³⁷²
	Temsirolimus	Alemtuzumab	1/2	44	CLL	En actiu	NCT00935792
		R-CHOP, R-FC	1/2	63	MCL	En actiu	NCT01389427
		Bendamustina + Rituximab	1/2	72	MCL, FL	En actiu	NCT01078142
	Ibrutinib	3	280	MCL	En actiu	NCT01646021	

Abreviatures: NHL, *Non-Hodgkin Lymphoma*; CLL, *Chronic Lymphocytic Leukemia*; MCL, *Mantle Cell Lymphoma*; FL, *Follicular Lymphoma*; R-CHOP, *rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone*; R-FC, *rituximab, fludarabine, cyclophosphamide*.

Les combinacions horitzontals com la inhibició de la cascada RAS/RAF/MEK/ERK amb els inhibidors de PI3K/AKT/mTOR són una altra estratègia terapèutica. Les dues vies promouen la proliferació cel·lular i la supervivència, i entre elles hi ha una extensa intercomunicació.³⁷³ Les combinacions de petits inhibidors de cinases però, poden incrementar els nivells de toxicitat. Els índex d'efectes adversos relacionats amb fàrmacs de grau 3 o 4 és del voltant del 18% en monoteràpia i aproximadament del 54% quan es combina un inhibidor de MAPK i un inhibidor de PI3K.³⁷⁴ Actualment, s'està desenvolupant un assaig clínic de fase III amb els inhibidors de cinases ibrutinib i temsirolimus, actualment aprovat pel tractament del MCL (NCT01646021).

Un altre mecanisme per aconseguir citotoxicitat sinèrgica entre fàrmacs es basa en la combinació amb agents proapoptòtics. Recentment, s'ha descrit que la combinació dels inhibidors de PI3K/AKT/mTOR i BH3-mimètics millora l'apoptosi a través d'un mecanisme dependent de BIM en la leucèmia mieloide aguda.^{342;375} Consistentment, vam trobar que NVP-BKM120 exercia un efecte sinèrgic amb el BH3-mimètic ABT-263, donant força al rol de la família de proteïnes BCL2 en l'apoptosi induïda per NVP-BKM120 en la CLL. En aquest mateix model, també s'ha observat que la combinació d'ABT-737 amb inhibidors de BTK o PI3K supera la resistència exercida per l'estimulació del BCR i restaura la citotoxicitat.³⁷⁶

El bloqueig de l'autofàgia proporciona una altra alternativa per augmentar l'apoptosi dels inhibidors de PI3K/AKT/mTOR.³²⁰ Ja que l'autofàgia és generalment una via de supervivència utilitzada per les cèl·lules tumorals per tolerar l'estrès metabòlic,^{319;377} els inhibidors de l'autofàgia, en combinació amb altres agents, s'espera que afectin eficientment les cèl·lules tumorals resistents a la teràpia en regions hipòxiques del tumor.²⁷¹ Compostos com la hidroxiclороquina o la cloroquina que bloquegen l'acidificació lisosomal, estan en diferents assaigs clínics en combinació amb agents estàndard o experimentals.³⁷⁸ En neoplàsies hematològiques, aquests agents estan essent provats en combinació amb ciclofosfamida i l'inhibidor del proteasoma bortezomib en mieloma múltiple (NCT01438177) o amb inhibidors de les desacetilases d'histones en la leucèmia mieloide aguda.³⁷⁹ Aquests estudis donen suport a considerar l'autofàgia com un mecanisme de resistència a la teràpia i, per tant, que la

hidroxicloroquina pot incrementar la citotoxicitat per inhibició de l'autofàgia. D'acord amb això, vam trobar que l'addició d'aquest agent a la combinació d'everolimus i AKTi-1/2 activa completament el programa intrínsec apoptòtic en cèl·lules de MCL bàsicament resistents a la teràpia contra les dues dianes AKT i mTOR. Malgrat tot, els inhibidors de l'autofàgia actuals no són agents completament específics i per tant, el desenvolupament d'inhibidors més selectius de la maquinària de l'autofàgia permetrà provar el potencial d'aquestes aproximacions.

7. Qüestions no resoltes

Els inhibidors de la via de PI3K/AKT/mTOR tenen el potencial d'inhibir la via amb una raonable eficàcia i bona tolerabilitat. La freqüència de les alteracions en aquesta via de senyalització encoratgen la investigació de noves indicacions potencials. Malgrat els reptes, s'han realitzat importants avanços que han conduït a l'aprovació per la FDA d'alguns d'aquests inhibidors, mentre que d'altres estan en avançades fases de desenvolupament.

Tot i això, hi ha tot de qüestions en les que cal aprofundir per entendre millor com aplicar adequadament aquests agents. Primerament, cal dedicar esforços a comprendre la complexitat d'aquesta via de senyalització. Per exemple, per definir els rols de les diferents isoformes de PI3K o per identificar tots els bucles que puguin existir –si és que no s'han descrit tots– i que atenuen l'efectivitat d'aquests agents. Amb el gran nombre de compostos desenvolupats, es fa difícil determinar si hi ha diferències en quant als seus efectes biològics o si hi ha diferències clíniques significatives entre ells. És possible que l'aplicabilitat de les diferents classes d'agents pugui dependre d'un context genètic específic i del tipus de tumor. Per tant, resulta fonamental disposar de biomarcadors fiables predictius de la resposta. Avui dia, però, encara no està clar quin és el millor marcador d'inhibició de la via. De la mateixa manera, es fa difícil de determinar l'impacte de la inhibició de PI3K/AKT/mTOR en pacients amb mutacions no activadores en comparació amb aquells que tenen evidències moleculars d'activació de la via. Finalment, caldrà determinar si l'ús d'aquests agents ha de ser en monoteràpia, o bé, en combinació.

En definitiva, sembla que tenir cura d'inhibir les diferents dianes terapèutiques en una població seleccionada de pacients, entendre la biologia de les intercomunicacions de senyalització cel·lular per optimitzar les combinacions, i modular el microambient tumoral per afavorir l'eradicació del tumor, poden ser factors fonamentals cap a una teràpia personalitzada efectiva.



Conclusions

Les conclusions derivades d'aquesta tesi doctoral són:

1. NVP-BKM120, un inhibidor de PI3K, indueix apoptosi selectiva en les cèl·lules de CLL de forma independent dels factors pronòstics.
2. El bloqueig que provoca NVP-BKM120 en la senyalització de la via de PI3K/AKT/FOXO3A comporta la inducció de BIM i la disminució de l'expressió de MCL1.
3. BIM contribueix funcionalment en l'apoptosi mitocondrial induïda per NVP-BKM120 en la CLL.
4. La combinació de NVP-BKM120 i ABT-263 és sinèrgica en cèl·lules de CLL.
5. NVP-BKM120 bloqueja la senyalització derivada de l'estimulació del BCR, incloent la inducció de les citocines CCL3 i CCL4.
6. NVP-BKM120 també és capaç d'induir citotoxicitat en presència dels senyals protectors derivats del microambient.
7. La combinació de NVP-BKM120 amb fludarabina o bendamustina és sinèrgica fins i tot en presència de cèl·lules estromals.
8. NVP-BKM120 inhibeix la polimerització d'actina i la migració de les cèl·lules de CLL envers CXCL12.
9. Everolimus, un inhibidor de mTOR, exerceix un efecte antitumoral selectiu en les cèl·lules de MCL.

10. Everolimus inhibeix la via de senyalització de mTOR a temps curts de tractament, mentre que després d'una exposició prolongada, la refosforilació d'AKT en limita la seva eficàcia.
11. La inhibició d'AKT mitjançant l'inhibidor Akti-1/2 incrementa l'activitat antitumoral d'everolimus en cèl·lules de MCL.
12. Les cèl·lules de MCL resistents a la combinació d'everolimus i Akti-1/2 tenen nivells elevats d'autofàgia.
13. La inhibició de l'autofàgia supera la resistència de les cèl·lules de MCL als inhibidors d'AKT/mTOR, conduint a la inducció eficient de l'apoptosi i suggerint un rol de prosupervivència de l'autofàgia.
14. NVP-BEZ235, un inhibidor dual de PI3K i mTOR, inhibeix la via de PI3K/AKT/mTOR en cèl·lules primàries de MCL més eficientment que everolimus o NVP-BKM120, fins i tot en presència de l'estroma.
15. La major capacitat antitumoral de NVP-BEZ235 està principalment associada a la modulació d'un gran nombre de gens relacionats amb la inflamació, la senyalització per citocines, l'angiogènesi i la invasió tumoral.
16. Únicament NVP-BEZ235 és capaç de bloquejar la senyalització de les interleucines IL4 i IL6 en cèl·lules primàries de MCL, en comparació amb everolimus o NVP-BKM120.
17. NVP-BEZ235 redueix significativament els processos de migració, invasió i angiogènesi en cèl·lules primàries de MCL.



Referències bibliogràfiques

1. Bosch F, Rosich L. The contributions of Paul Ehrlich to pharmacology: a tribute on the occasion of the centenary of his Nobel Prize. *Pharmacology* 2008;82:171-179.
2. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* 1996;2:561-566.
3. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL et al. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood* 2011;117:5019-5032.
4. Young RM, Staudt LM. Targeting pathological B cell receptor signalling in lymphoid malignancies. *Nat.Rev.Drug Discov.* 2013;12:229-243.
5. Banks PM, Chan J, Cleary ML et al. Mantle cell lymphoma. A proposal for unification of morphologic, immunologic, and molecular data. *Am.J.Surg.Pathol.* 1992;16:637-640.
6. Bosch F, Jares P, Campo E et al. PRAD-1/cyclin D1 gene overexpression in chronic lymphoproliferative disorders: a highly specific marker of mantle cell lymphoma. *Blood* 1994;84:2726-2732.
7. Ferrer A, Salaverria I, Bosch F et al. Leukemic involvement is a common feature in mantle cell lymphoma. *Cancer* 2007;109:2473-2480.
8. Caballero D, Campo E, Lopez-Guillermo A et al. Clinical practice guidelines for diagnosis, treatment, and follow-up of patients with mantle cell lymphoma. Recommendations from the GEL/TAMO Spanish Cooperative Group. *Ann Hematol* 2013;92:1151-1179.
9. Sant M, Allemani C, Tereanu C et al. Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood* 2010;116:3724-3734.
10. Vose JM. Mantle cell lymphoma: 2013 Update on diagnosis, risk-stratification, and clinical management. *Am J Hematol* 2013;88:1082-1088.
11. Herrmann A, Hoster E, Zwingers T et al. Improvement of overall survival in advanced stage mantle cell lymphoma. *J.Clin.Oncol.* 2009;27:511-518.
12. Martin P, Chadburn A, Christos P et al. Intensive treatment strategies may not provide superior outcomes in mantle cell lymphoma: overall survival exceeding 7 years with standard therapies. *Ann.Oncol.* 2008;19:1327-1330.
13. Perez-Galan P, Dreyling M, Wiestner A. Mantle cell lymphoma: biology, pathogenesis, and the molecular basis of treatment in the genomic era. *Blood* 2011;117:26-38.
14. Walsh SH, Thorselius M, Johnson A et al. Mutated VH genes and preferential VH3-21 use define new subsets of mantle cell lymphoma. *Blood* 2003;101:4047-4054.
15. Hadzidimitriou A, Agathangelidis A, Darzentas N et al. Is there a role for antigen selection in mantle cell lymphoma? Immunogenetic support from a series of 807 cases. *Blood* 2011;118:3088-3095.

16. Del G, I, Messina M, Chiaretti S et al. Behind the scenes of non-nodal MCL: downmodulation of genes involved in actin cytoskeleton organization, cell projection, cell adhesion, tumour invasion, TP53 pathway and mutated status of immunoglobulin heavy chain genes. *Br.J.Haematol.* 2012;156:601-611.
17. Royo C, Navarro A, Clot G et al. Non-nodal type of mantle cell lymphoma is a specific biological and clinical subgroup of the disease. *Leukemia* 2012;26:1895-1898.
18. Fernandez V, Salamero O, Espinet B et al. Genomic and gene expression profiling defines indolent forms of mantle cell lymphoma. *Cancer Res.* 2010;70:1408-1418.
19. Navarro A, Clot G, Royo C et al. Molecular subsets of mantle cell lymphoma defined by the IGHV mutational status and SOX11 expression have distinct biologic and clinical features. *Cancer Res.* 2012;72:5307-5316.
20. Jares P, Colomer D, Campo E. Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma. *J.Clin.Invest* 2012;122:3416-3423.
21. Wiestner A, Tehrani M, Chiorazzi M et al. Point mutations and genomic deletions in CCND1 create stable truncated cyclin D1 mRNAs that are associated with increased proliferation rate and shorter survival. *Blood* 2007;109:4599-4606.
22. Bea S, Salaverria I, Armengol L et al. Uniparental disomies, homozygous deletions, amplifications, and target genes in mantle cell lymphoma revealed by integrative high-resolution whole-genome profiling. *Blood* 2009;113:3059-3069.
23. Casimiro MC, Crosariol M, Loro E et al. ChIP sequencing of cyclin D1 reveals a transcriptional role in chromosomal instability in mice. *J.Clin.Invest* 2012;122:833-843.
24. Bartek J, Lukas J. DNA repair: Cyclin D1 multitasks. *Nature* 2011;474:171-172.
25. Beltran E, Fresquet V, Martinez-Useros J et al. A cyclin-D1 interaction with BAX underlies its oncogenic role and potential as a therapeutic target in mantle cell lymphoma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2011;108:12461-12466.
26. Roue G, Pichereau V, Lincet H, Colomer D, Sola B. Cyclin D1 mediates resistance to apoptosis through upregulation of molecular chaperones and consequent redistribution of cell death regulators. *Oncogene* 2008;27:4909-4920.
27. Gesk S, Klapper W, Martin-Subero JI et al. A chromosomal translocation in cyclin D1-negative/cyclin D2-positive mantle cell lymphoma fuses the CCND2 gene to the IGK locus. *Blood* 2006;108:1109-1110.
28. Salaverria I, Royo C, Carvajal-Cuenca A et al. CCND2 rearrangements are the most frequent genetic events in cyclin D1(-) mantle cell lymphoma. *Blood* 2013;121:1394-1402.
29. Mozos A, Royo C, Hartmann E et al. SOX11 expression is highly specific for mantle cell lymphoma and identifies the cyclin D1-negative subtype. *Haematologica* 2009;94:1555-1562.

30. Hernandez L, Fest T, Cazorla M et al. p53 gene mutations and protein overexpression are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas. *Blood* 1996;87:3351-3359.
31. Pinyol M, Bea S, Pla L et al. Inactivation of RB1 in mantle-cell lymphoma detected by nonsense-mediated mRNA decay pathway inhibition and microarray analysis. *Blood* 2007;109:5422-5429.
32. Hernandez L, Bea S, Pinyol M et al. CDK4 and MDM2 gene alterations mainly occur in highly proliferative and aggressive mantle cell lymphomas with wild-type INK4a/ARF locus. *Cancer Res.* 2005;65:2199-2206.
33. Camacho E, Hernandez L, Hernandez S et al. ATM gene inactivation in mantle cell lymphoma mainly occurs by truncating mutations and missense mutations involving the phosphatidylinositol-3 kinase domain and is associated with increasing numbers of chromosomal imbalances. *Blood* 2002;99:238-244.
34. Jares P, Colomer D, Campo E. Genetic and molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: perspectives for new targeted therapeutics. *Nat.Rev.Cancer* 2007;7:750-762.
35. Bea S, Valdes-Mas R, Navarro A et al. Landscape of somatic mutations and clonal evolution in mantle cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:18250-18255.
36. Hartmann EM, Campo E, Wright G et al. Pathway discovery in mantle cell lymphoma by integrated analysis of high-resolution gene expression and copy number profiling. *Blood* 2010;116:953-961.
37. Katz SG, Labelle JL, Meng H et al. Mantle cell lymphoma in cyclin D1 transgenic mice with Bim-deficient B cells. *Blood* 2014;123:884-893.
38. Kridel R, Meissner B, Rogic S et al. Whole transcriptome sequencing reveals recurrent NOTCH1 mutations in mantle cell lymphoma. *Blood* 2012;119:1963-1971.
39. Gelebart P, Anand M, Armanious H et al. Constitutive activation of the Wnt canonical pathway in mantle cell lymphoma. *Blood* 2008;112:5171-5179.
40. Medina DJ, Goodell L, Glod J et al. Mesenchymal stromal cells protect mantle cell lymphoma cells from spontaneous and drug-induced apoptosis through secretion of B-cell activating factor and activation of the canonical and non-canonical nuclear factor kappaB pathways. *Haematologica* 2012;97:1255-1263.
41. Schrader C, Meusers P, Brittinger G et al. Growth pattern and distribution of follicular dendritic cells in mantle cell lymphoma: a clinicopathological study of 96 patients. *Virchows Arch.* 2006;448:151-159.
42. Lwin T, Lin J, Choi YS et al. Follicular dendritic cell-dependent drug resistance of non-Hodgkin lymphoma involves cell adhesion-mediated Bim down-regulation through induction of microRNA-181a. *Blood* 2010;116:5228-5236.

43. Burger JA, Ford RJ. The microenvironment in mantle cell lymphoma: cellular and molecular pathways and emerging targeted therapies. *Semin.Cancer Biol.* 2011;21:308-312.
44. Pighi C, Gu TL, Dalai I et al. Phospho-proteomic analysis of mantle cell lymphoma cells suggests a pro-survival role of B-cell receptor signaling. *Cell Oncol.(Dordr.)* 2011;34:141-153.
45. Lai R, Rassidakis GZ, Medeiros LJ et al. Expression of STAT3 and its phosphorylated forms in mantle cell lymphoma cell lines and tumours. *J.Pathol.* 2003;199:84-89.
46. Zhang L, Yang J, Qian J et al. Role of the microenvironment in mantle cell lymphoma: IL-6 is an important survival factor for the tumor cells. *Blood* 2012;120:3783-3792.
47. Castillo R, Mascarenhas J, Telford W et al. Proliferative response of mantle cell lymphoma cells stimulated by CD40 ligation and IL-4. *Leukemia* 2000;14:292-298.
48. Kurtova AV, Tamayo AT, Ford RJ, Burger JA. Mantle cell lymphoma cells express high levels of CXCR4, CXCR5, and VLA-4 (CD49d): importance for interactions with the stromal microenvironment and specific targeting. *Blood* 2009;113:4604-4613.
49. Tiemann M, Schrader C, Klapper W et al. Histopathology, cell proliferation indices and clinical outcome in 304 patients with mantle cell lymphoma (MCL): a clinicopathological study from the European MCL Network. *Br.J.Haematol.* 2005;131:29-38.
50. Rosenwald A, Wright G, Wiestner A et al. The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma. *Cancer Cell* 2003;3:185-197.
51. Wang ML, Rule S, Martin P et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed or refractory mantle-cell lymphoma. *N.Engl.J.Med.* 2013;369:507-516.
52. Mato AR, Feldman T, Goy A. Proteasome inhibition and combination therapy for non-Hodgkin's lymphoma: from bench to bedside. *Oncologist.* 2012;17:694-707.
53. Hess G, Herbrecht R, Romaguera J et al. Phase III study to evaluate temsirolimus compared with investigator's choice therapy for the treatment of relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *J Clin.Oncol.* 2009;27:3822-3829.
54. Ansell SM, Inwards DJ, Rowland KM, Jr. et al. Low-dose, single-agent temsirolimus for relapsed mantle cell lymphoma: a phase 2 trial in the North Central Cancer Treatment Group. *Cancer* 2008;113:508-514.
55. Zinzani PL, Vose JM, Czuczman MS et al. Long-term follow-up of lenalidomide in relapsed/refractory mantle cell lymphoma: subset analysis of the NHL-003 study. *Ann.Oncol.* 2013;24:2892-2897.
56. Vose JM, Habermann TM, Czuczman MS et al. Single-agent lenalidomide is active in patients with relapsed or refractory aggressive non-Hodgkin lymphoma who received prior stem cell transplantation. *Br.J.Haematol.* 2013;162:639-647.

57. Gaidano G, Foa R, la-Favera R. Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *J.Clin.Invest* 2012;122:3432-3438.
58. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J.Clin.* 2013;63:11-30.
59. Dameshek W. Chronic lymphocytic leukemia--an accumulative disease of immunologically incompetent lymphocytes. *Blood* 1967;29:Suppl-84.
60. Messmer BT, Messmer D, Allen SL et al. In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J.Clin.Invest* 2005;115:755-764.
61. Dores GM, Anderson WF, Curtis RE et al. Chronic lymphocytic leukaemia and small lymphocytic lymphoma: overview of the descriptive epidemiology. *Br.J.Haematol.* 2007;139:809-819.
62. Inamdar KV, Bueso-Ramos CE. Pathology of chronic lymphocytic leukemia: an update. *Ann Diagn.Pathol* 2007;11:363-389.
63. Gribben JG. How I treat CLL up front. *Blood* 2010;115:187-197.
64. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* 2008;111:5446-5456.
65. Kipps TJ. Immunoglobulin genes in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Cells* 1993;19:615-625.
66. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA et al. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J.Exp.Med.* 2001;194:1625-1638.
67. Stevenson FK, Caligaris-Cappio F. Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood* 2004;103:4389-4395.
68. Agathangelidis A, Darzentas N, Hadzidimitriou A et al. Stereotyped B-cell receptors in one-third of chronic lymphocytic leukemia: a molecular classification with implications for targeted therapies. *Blood* 2012;119:4467-4475.
69. Kulis M, Heath S, Bibikova M et al. Epigenomic analysis detects widespread genome-wide DNA hypomethylation in chronic lymphocytic leukemia. *Nat.Genet.* 2012;44:1236-1242.
70. Ghia P, Caligaris-Cappio F. Monoclonal B-cell lymphocytosis: right track or red herring? *Blood* 2012;119:4358-4362.
71. Zenz T, Gribben JG, Hallek M et al. Risk categories and refractory CLL in the era of chemoimmunotherapy. *Blood* 2012;119:4101-4107.
72. Chigrinova E, Rinaldi A, Kwee I et al. Two main genetic pathways lead to the transformation of chronic lymphocytic leukemia to Richter syndrome. *Blood* 2013;122:2673-2682.

73. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N.Engl.J.Med.* 2000;343:1910-1916.
74. Rossi D, Sozzi E, Puma A et al. The prognosis of clinical monoclonal B cell lymphocytosis differs from prognosis of Rai 0 chronic lymphocytic leukaemia and is recapitulated by biological risk factors. *Br.J.Haematol.* 2009;146:64-75.
75. Migliazza A, Bosch F, Komatsu H et al. Nucleotide sequence, transcription map, and mutation analysis of the 13q14 chromosomal region deleted in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001;97:2098-2104.
76. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:13944-13949.
77. Liu J, Chen G, Feng L et al. Loss of p53 and altered miR15-a/16-1->MCL-1 pathway in CLL: insights from TCL1-Tg;p53(-/-) mouse model and primary human leukemia cells. *Leukemia* 2014;28:118-128.
78. Stankovic T, Weber P, Stewart G et al. Inactivation of ataxia telangiectasia mutated gene in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 1999;353:26-29.
79. Gonzalez D, Martinez P, Wade R et al. Mutational status of the TP53 gene as a predictor of response and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the LRF CLL4 trial. *J.Clin.Oncol.* 2011;29:2223-2229.
80. Puente XS, Pinyol M, Quesada V et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 2011;475:101-105.
81. Rossi D, Rasi S, Fabbri G et al. Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2012;119:521-529.
82. Quesada V, Conde L, Villamor N et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat.Genet.* 2012;44:47-52.
83. Rossi D, Fangazio M, Rasi S et al. Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2012;119:2854-2862.
84. Ngo VN, Young RM, Schmitz R et al. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature* 2011;470:115-119.
85. Ramsay AJ, Quesada V, Foronda M et al. POT1 mutations cause telomere dysfunction in chronic lymphocytic leukemia. *Nat.Genet.* 2013;45:526-530.
86. Martin-Subero JI, Lopez-Otin C, Campo E. Genetic and epigenetic basis of chronic lymphocytic leukemia. *Curr.Opin.Hematol.* 2013;20:362-368.
87. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP et al. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975;46:219-234.
88. Binet JL, Auquier A, Dighiero G et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981;48:198-206.

89. Cramer P, Hallek M. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia-what do we need to know? *Nat.Rev.Clin.Oncol.* 2011;8:38-47.
90. Zenz T, Mertens D, Kuppers R, Dohner H, Stilgenbauer S. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat.Rev.Cancer* 2010;10:37-50.
91. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;94:1848-1854.
92. Hamblin TJ, Davis ZA, Oscier DG. Determination of how many immunoglobulin variable region heavy chain mutations are allowable in unmutated chronic lymphocytic leukaemia - long-term follow up of patients with different percentages of mutations. *Br.J.Haematol.* 2008;140:320-323.
93. Richardson SJ, Matthews C, Catherwood MA et al. ZAP-70 expression is associated with enhanced ability to respond to migratory and survival signals in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood* 2006;107:3584-3592.
94. Damle RN, Wasil T, Fais F et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;94:1840-1847.
95. Villamor N, Conde L, Martinez-Trillos A et al. NOTCH1 mutations identify a genetic subgroup of chronic lymphocytic leukemia patients with high risk of transformation and poor outcome. *Leukemia* 2013;27:1100-1106.
96. Rossi D, Rasi S, Spina V et al. Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2013;121:1403-1412.
97. Rossi D, Spina V, Deambrogi C et al. The genetics of Richter syndrome reveals disease heterogeneity and predicts survival after transformation. *Blood* 2011;117:3391-3401.
98. Burger JA, Montserrat E. Coming full circle: 70 years of chronic lymphocytic leukemia cell redistribution, from glucocorticoids to inhibitors of B-cell receptor signaling. *Blood* 2013;121:1501-1509.
99. Moser B, Loetscher P. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat.Immunol.* 2001;2:123-128.
100. Herishanu Y, Perez-Galan P, Liu D et al. The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011;117:563-574.
101. Lutzny G, Kocher T, Schmidt-Supprian M et al. Protein kinase c-beta-dependent activation of NF-kappaB in stromal cells is indispensable for the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells in vivo. *Cancer Cell* 2013;23:77-92.
102. Nishio M, Endo T, Tsukada N et al. Nurselike cells express BAFF and APRIL, which can promote survival of chronic lymphocytic leukemia cells via a paracrine pathway distinct from that of SDF-1alpha. *Blood* 2005;106:1012-1020.

103. Brachtl G, Sahakyan K, Denk U et al. Differential bone marrow homing capacity of VLA-4 and CD38 high expressing chronic lymphocytic leukemia cells. *PLoS.One.* 2011;6:e23758.
104. Burger JA. Chemokines and chemokine receptors in chronic lymphocytic leukemia (CLL): from understanding the basics towards therapeutic targeting. *Semin.Cancer Biol.* 2010;20:424-430.
105. Burger JA, Quiroga MP, Hartmann E et al. High-level expression of the T-cell chemokines CCL3 and CCL4 by chronic lymphocytic leukemia B cells in nurselike cell cocultures and after BCR stimulation. *Blood* 2009;113:3050-3058.
106. Hallek M. Signaling the end of chronic lymphocytic leukemia: new frontline treatment strategies. *Blood* 2013;122:3723-3734.
107. Roue G, Lopez-Guerra M, Milpied P et al. Bendamustine is effective in p53-deficient B-cell neoplasms and requires oxidative stress and caspase-independent signaling. *Clin.Cancer Res.* 2008;14:6907-6915.
108. Cheson BD, Rummel MJ. Bendamustine: rebirth of an old drug. *J Clin Oncol* 2009;27:1492-1501.
109. Bottcher S, Ritgen M, Fischer K et al. Minimal residual disease quantification is an independent predictor of progression-free and overall survival in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate analysis from the randomized GCLLSG CLL8 trial. *J.Clin.Oncol.* 2012;30:980-988.
110. Moreton P, Kennedy B, Lucas G et al. Eradication of minimal residual disease in B-cell chronic lymphocytic leukemia after alemtuzumab therapy is associated with prolonged survival. *J.Clin.Oncol.* 2005;23:2971-2979.
111. Bosch F, Abrisqueta P, Villamor N et al. Rituximab, fludarabine, cyclophosphamide, and mitoxantrone: a new, highly active chemoimmunotherapy regimen for chronic lymphocytic leukemia. *J.Clin.Oncol.* 2009;27:4578-4584.
112. Fischer K, Cramer P, Busch R et al. Bendamustine in combination with rituximab for previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia: a multicenter phase II trial of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *J Clin Oncol* 2012;30:3209-3216.
113. Dreger P, Corradini P, Kimby E et al. Indications for allogeneic stem cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia: the EBMT transplant consensus. *Leukemia* 2007;21:12-17.
114. Rossi D, Brusca A, Spina V et al. Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine-refractoriness. *Blood* 2011;118:6904-6908.
115. Messina M, Del G, I, Khiabani H et al. Genetic lesions associated with chronic lymphocytic leukemia chemo-refractoriness. *Blood* 2014
116. Landau DA, Carter SL, Stojanov P et al. Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell* 2013;152:714-726.

117. Puente XS, Lopez-Otin C. The evolutionary biography of chronic lymphocytic leukemia. *Nat.Genet.* 2013;45:229-231.
118. Friedberg JW, Sharman J, Sweetenham J et al. Inhibition of Syk with fostamatinib disodium has significant clinical activity in non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2010;115:2578-2585.
119. Byrd JC, Furman RR, Coutre SE et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N.Engl.J.Med.* 2013;369:32-42.
120. Brown JR, Byrd JC, Coutre SE et al. Idelalisib, an inhibitor of phosphatidylinositol 3 kinase p110 δ , for relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2014
121. Younes A, Flinn I, Berdeja J, Friedberg JW et al. Combining Ibrutinib With Rituximab, Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone (R-CHOP): Updated Results From a Phase 1b Study In Treatment-Naïve Patients With CD20-Positive B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma (NHL). *Blood* 2013;122:852.
122. Furman RR, Sharman JP, Coutre SE et al. Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N.Engl.J.Med.* 2014;370:997-1007.
123. De Vos S, Furman RR, Barrientos JC, Wagner-Johnston ND et al. Idelalisib, a Selective Inhibitor Of PI3K δ , In Combination With Bendamustine, Fludarabine Or Chlorambucil In Patients With Relapsed Or Refractory (R/R) Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). *Blood* 2013;122:2878.
124. Burger JA, Keating MJ, Wierda WG, Hoellenriegel J et al. Ibrutinib In Combination With Rituximab (iR) Is Well Tolerated and Induces a High Rate Of Durable Remissions In Patients With High-Risk Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL): New, Updated Results Of a Phase II Trial In 40 Patients. *Blood* 2013;122:675.
125. Barrientos JC, Wagner-Johnston ND, De Vos S, Coutre SE et al. Chemo-Immunotherapy Combination Of Idelalisib With Bendamustine/Rituximab Or Chlorambucil/Rituximab In Patients With Relapsed/Refractory CLL Demonstrates Efficacy and Tolerability. *Blood* 2013;122:4176.
126. Zhang J, Yang PL, Gray NS. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat.Rev.Cancer* 2009;9:28-39.
127. Schmitz R, Young RM, Ceribelli M et al. Burkitt lymphoma pathogenesis and therapeutic targets from structural and functional genomics. *Nature* 2012;490:116-120.
128. Buchner M, Fuchs S, Prinz G et al. Spleen tyrosine kinase is overexpressed and represents a potential therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res.* 2009;69:5424-5432.
129. Rinaldi A, Kwee I, Taborelli M et al. Genomic and expression profiling identifies the B-cell associated tyrosine kinase Syk as a possible therapeutic target in mantle cell lymphoma. *Br.J.Haematol.* 2006;132:303-316.

130. Gobessi S, Laurenti L, Longo PG et al. Inhibition of constitutive and BCR-induced Syk activation downregulates Mcl-1 and induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia* 2009;23:686-697.
131. Quiroga MP, Balakrishnan K, Kurtova AV et al. B-cell antigen receptor signaling enhances chronic lymphocytic leukemia cell migration and survival: specific targeting with a novel spleen tyrosine kinase inhibitor, R406. *Blood* 2009;114:1029-1037.
132. Buchner M, Baer C, Prinz G et al. Spleen tyrosine kinase inhibition prevents chemokine- and integrin-mediated stromal protective effects in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2010;115:4497-4506.
133. Suljagic M, Longo PG, Bennardo S et al. The Syk inhibitor fostamatinib disodium (R788) inhibits tumor growth in the Emu- TCL1 transgenic mouse model of CLL by blocking antigen-dependent B-cell receptor signaling. *Blood* 2010;116:4894-4905.
134. Herman SE, Barr PM, McAuley EM et al. Fostamatinib inhibits B-cell receptor signaling, cellular activation and tumor proliferation in patients with relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2013;27:1769-1773.
135. Cinar M, Hamedani F, Mo Z et al. Bruton tyrosine kinase is commonly overexpressed in mantle cell lymphoma and its attenuation by ibrutinib induces apoptosis. *Leuk.Res.* 2013;37:1271-1277.
136. Woyach JA, Bojnik E, Ruppert AS et al. Bruton's tyrosine kinase (BTK) function is important to the development and expansion of chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Blood* 2014;123:1207-1213.
137. Pan Z, Scheerens H, Li SJ et al. Discovery of selective irreversible inhibitors for Bruton's tyrosine kinase. *ChemMedChem.* 2007;2:58-61.
138. Herman SE, Gordon AL, Hertlein E et al. Bruton tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765. *Blood* 2011;117:6287-6296.
139. Ponader S, Chen SS, Buggy JJ et al. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 thwarts chronic lymphocytic leukemia cell survival and tissue homing in vitro and in vivo. *Blood* 2012;119:1182-1189.
140. De Rooij MF, Kuil A, Geest CR et al. The clinically active BTK inhibitor PCI-32765 targets B-cell receptor- and chemokine-controlled adhesion and migration in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2012;119:2590-2594.
141. Chang BY, Francesco M, De Rooij MF et al. Egress of CD19(+)CD5(+) cells into peripheral blood following treatment with the Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib in mantle cell lymphoma patients. *Blood* 2013;122:2412-2424.
142. Advani RH, Buggy JJ, Sharman JP et al. Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) has significant activity in patients with relapsed/refractory B-cell malignancies. *J.Clin.Oncol.* 2013;31:88-94.

143. O'Brien S, Furman RR, Coutre SE et al. Ibrutinib as initial therapy for elderly patients with chronic lymphocytic leukaemia or small lymphocytic lymphoma: an open-label, multicentre, phase 1b/2 trial. *Lancet Oncol* 2014;15:48-58.
144. Woyach JA, Smucker K, Smith LL et al. Prolonged lymphocytosis during ibrutinib therapy is associated with distinct molecular characteristics and does not indicate a suboptimal response to therapy. *Blood* 2014;123:1810-1817.
145. Cameron F, Sanford M. Ibrutinib: first global approval. *Drugs* 2014;74:263-271.
146. Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* 2008;27:5497-5510.
147. Courtney KD, Corcoran RB, Engelman JA. The PI3K pathway as drug target in human cancer. *J.Clin.Oncol.* 2010;28:1075-1083.
148. Rodon J, Dienstmann R, Serra V, Tabernero J. Development of PI3K inhibitors: lessons learned from early clinical trials. *Nat.Rev.Clin.Oncol.* 2013;10:143-153.
149. Fruman DA, Rommel C. PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 2014;13:140-156.
150. So L, Fruman DA. PI3K signalling in B- and T-lymphocytes: new developments and therapeutic advances. *Biochem.J.* 2012;442:465-481.
151. Jaber N, Dou Z, Chen JS et al. Class III PI3K Vps34 plays an essential role in autophagy and in heart and liver function. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2012;109:2003-2008.
152. Vanhaesebroeck B, Guillermet-Guibert J, Graupera M, Bilanges B. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2010;11:329-341.
153. Kok K, Geering B, Vanhaesebroeck B. Regulation of phosphoinositide 3-kinase expression in health and disease. *Trends Biochem.Sci.* 2009;34:115-127.
154. Ramadani F, Bolland DJ, Garcon F et al. The PI3K isoforms p110alpha and p110delta are essential for pre-B cell receptor signaling and B cell development. *Sci.Signal.* 2010;3:ra60.
155. Srinivasan L, Sasaki Y, Calado DP et al. PI3 kinase signals BCR-dependent mature B cell survival. *Cell* 2009;139:573-586.
156. Okkenhaug K, Ali K, Vanhaesebroeck B. Antigen receptor signalling: a distinctive role for the p110delta isoform of PI3K. *Trends Immunol.* 2007;28:80-87.
157. Iyengar S, Clear A, Bodor C et al. P110alpha-mediated constitutive PI3K signaling limits the efficacy of p110delta-selective inhibition in mantle cell lymphoma, particularly with multiple relapse. *Blood* 2013;121:2274-2284.
158. Jia S, Liu Z, Zhang S et al. Essential roles of PI(3)K-p110beta in cell growth, metabolism and tumorigenesis. *Nature* 2008;454:776-779.
159. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* 2004;304:554.

160. Ringshausen I, Schneller F, Bogner C et al. Constitutively activated phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) is involved in the defect of apoptosis in B-CLL: association with protein kinase Cdelta. *Blood* 2002;100:3741-3748.
161. Psyrrri A, Papageorgiou S, Liakata E et al. Phosphatidylinositol 3'-kinase catalytic subunit alpha gene amplification contributes to the pathogenesis of mantle cell lymphoma. *Clin.Cancer Res.* 2009;15:5724-5732.
162. Shapiro GI, Rodon J, Bedell C et al. Phase I safety, pharmacokinetic, and pharmacodynamic study of SAR245408 (XL147), an oral pan-class I PI3K inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 2014;20:233-245.
163. Mao X, Cao B, Wood TE et al. A small-molecule inhibitor of D-cyclin transactivation displays preclinical efficacy in myeloma and leukemia via phosphoinositide 3-kinase pathway. *Blood* 2011;117:1986-1997.
164. Glauer J, Pletz N, Schon M et al. A novel selective small-molecule PI3K inhibitor is effective against human multiple myeloma in vitro and in vivo. *Blood Cancer J.* 2013;3:e141.
165. Hong DS, Bowles DW, Falchook GS et al. A multicenter phase I trial of PX-866, an oral irreversible phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Clin.Cancer Res.* 2012;18:4173-4182.
166. de FM, Iglesias-Serret D, Cosialls AM et al. Isoform-selective phosphoinositide 3-kinase inhibitors induce apoptosis in chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br.J.Haematol.* 2010;150:108-111.
167. So L, Yea SS, Oak JS et al. Selective inhibition of phosphoinositide 3-kinase p110alpha preserves lymphocyte function. *J.Biol.Chem.* 2013;288:5718-5731.
168. Furet P, Guagnano V, Fairhurst RA et al. Discovery of NVP-BYL719 a potent and selective phosphatidylinositol-3 kinase alpha inhibitor selected for clinical evaluation. *Bioorg.Med.Chem.Lett.* 2013;23:3741-3748.
169. Ni J, Liu Q, Xie S et al. Functional characterization of an isoform-selective inhibitor of PI3K-p110beta as a potential anticancer agent. *Cancer Discov.* 2012;2:425-433.
170. Folkes AJ, Ahmadi K, Alderton WK et al. The identification of 2-(1H-indazol-4-yl)-6-(4-methanesulfonyl-piperazin-1-ylmethyl)-4-morpholin-4-yl-thieno[3,2d]pyrimidine (GDC-0941) as a potent, selective, orally bioavailable inhibitor of class I PI3 kinase for the treatment of cancer. *J.Med.Chem.* 2008;51:5522-5532.
171. Tabe Y, Jin L, Konopleva M et al. Class IA PI3K inhibition inhibits cell growth and proliferation in mantle cell lymphoma. *Acta Haematol.* 2014;131:59-69.
172. Flinn I, Patel M, Kahl BS, Horwitz SM et al. Preliminary Safety and Efficacy Of IPI-145, a Potent Inhibitor Of Phosphoinositide-3-Kinase- δ,γ , In Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood* 2013;122:677.
173. Ikeda H, Hideshima T, Fulciniti M et al. PI3K/p110{delta} is a novel therapeutic target in multiple myeloma. *Blood* 2010;116:1460-1468.

174. Lannutti BJ, Meadows SA, Herman SE et al. CAL-101, a p110delta selective phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor for the treatment of B-cell malignancies, inhibits PI3K signaling and cellular viability. *Blood* 2011;117:591-594.
175. Herman SE, Gordon AL, Wagner AJ et al. Phosphatidylinositol 3-kinase-delta inhibitor CAL-101 shows promising preclinical activity in chronic lymphocytic leukemia by antagonizing intrinsic and extrinsic cellular survival signals. *Blood* 2010;116:2078-2088.
176. Hoellenriegel J, Meadows SA, Sivina M et al. The phosphoinositide 3'-kinase delta inhibitor, CAL-101, inhibits B-cell receptor signaling and chemokine networks in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011;118:3603-3612.
177. Kahl BS, Spurgeon SE, Furman RR et al. Results of a phase I study of idelalisib, a PI3K δ inhibitor, in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma (MCL). *Blood* 2014
178. Fiorcari S, Brown WS, McIntyre BW et al. The PI3-Kinase Delta Inhibitor Idelalisib (GS-1101) Targets Integrin-Mediated Adhesion of Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) Cell to Endothelial and Marrow Stromal Cells. *PLoS.One.* 2013;8:e83830.
179. Maira SM, Pecchi S, Huang A et al. Identification and characterization of NVP-BKM120, an orally available pan-class I PI3-kinase inhibitor. *Mol.Cancer Ther.* 2012;11:317-328.
180. Brachmann SM, Kleylein-Sohn J, Gaulis S et al. Characterization of the mechanism of action of the pan class I PI3K inhibitor NVP-BKM120 across a broad range of concentrations. *Mol.Cancer Ther.* 2012;11:1747-1757.
181. Koul D, Fu J, Shen R et al. Antitumor activity of NVP-BKM120--a selective pan class I PI3 kinase inhibitor showed differential forms of cell death based on p53 status of glioma cells. *Clin Cancer Res* 2012;18:184-195.
182. Mueller A, Bachmann E, Linnig M et al. Selective PI3K inhibition by BKM120 and BEZ235 alone or in combination with chemotherapy in wild-type and mutated human gastrointestinal cancer cell lines. *Cancer Chemother.Pharmacol* 2012;69:1601-1615.
183. Ren H, Zhao L, Li Y et al. The PI3 kinase inhibitor NVP-BKM120 induces GSK3/FBXW7-dependent Mcl-1 degradation, contributing to induction of apoptosis and enhancement of TRAIL-induced apoptosis. *Cancer Lett.* 2013;338:229-238.
184. Lonetti A, Antunes IL, Chiarini F et al. Activity of the pan-class I phosphoinositide 3-kinase inhibitor NVP-BKM120 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2013
185. Zheng Y, Yang J, Qian J et al. Novel phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor NVP-BKM120 induces apoptosis in myeloma cells and shows synergistic anti-myeloma activity with dexamethasone. *J Mol Med (Berl)* 2012;90:695-706.

186. Zang C, Eucker J, Liu H et al. Concurrent inhibition of PI3-kinase and mTOR induces cell death in diffuse large B cell lymphomas, a mechanism involving down regulation of Mcl-1. *Cancer Lett.* 2013;339:288-297.
187. Amrein L, Shawi M, Grenier J, Aloyz R, Panasci L. The phosphatidylinositol-3 kinase I inhibitor BKM120 induces cell death in B-chronic lymphocytic leukemia cells in vitro. *Int J Cancer* 2013;133:247-252.
188. Niedermeier M, Hennessy BT, Knight ZA et al. Isoform-selective phosphoinositide 3'-kinase inhibitors inhibit CXCR4 signaling and overcome stromal cell-mediated drug resistance in chronic lymphocytic leukemia: a novel therapeutic approach. *Blood* 2009;113:5549-5557.
189. Bendell JC, Rodon J, Burris HA et al. Phase I, dose-escalation study of BKM120, an oral pan-Class I PI3K inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 2012;30:282-290.
190. Myatt SS, Lam EW. The emerging roles of forkhead box (Fox) proteins in cancer. *Nat.Rev.Cancer* 2007;7:847-859.
191. Cheung M, Testa JR. Diverse mechanisms of AKT pathway activation in human malignancy. *Curr.Cancer Drug Targets.* 2013;13:234-244.
192. Polak R, Buitenhuis M. The PI3K/PKB signaling module as key regulator of hematopoiesis: implications for therapeutic strategies in leukemia. *Blood* 2012;119:911-923.
193. Mahmoud IS, Sughayer MA, Mohammad HA et al. The transforming mutation E17K/AKT1 is not a major event in B-cell-derived lymphoid leukaemias. *Br.J.Cancer* 2008;99:488-490.
194. Zhuang J, Hawkins SF, Glenn MA et al. Akt is activated in chronic lymphocytic leukemia cells and delivers a pro-survival signal: the therapeutic potential of Akt inhibition. *Haematologica* 2010;95:110-118.
195. Rudelius M, Pittaluga S, Nishizuka S et al. Constitutive activation of Akt contributes to the pathogenesis and survival of mantle cell lymphoma. *Blood* 2006;108:1668-1676.
196. Levy DS, Kahana JA, Kumar R. AKT inhibitor, GSK690693, induces growth inhibition and apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Blood* 2009;113:1723-1729.
197. Altomare DA, Zhang L, Deng J et al. GSK690693 delays tumor onset and progression in genetically defined mouse models expressing activated Akt. *Clin.Cancer Res.* 2010;16:486-496.
198. Lin J, Sampath D, Nannini MA et al. Targeting activated Akt with GDC-0068, a novel selective Akt inhibitor that is efficacious in multiple tumor models. *Clin.Cancer Res.* 2013;19:1760-1772.
199. Yan Y, Serra V, Prudkin L et al. Evaluation and clinical analyses of downstream targets of the Akt inhibitor GDC-0068. *Clin Cancer Res* 2013;19:6976-6986.

200. Ding W, Shanafelt TD, Lesnick CE et al. Akt inhibitor MK2206 selectively targets CLL B-cell receptor induced cytokines, mobilizes lymphocytes and synergizes with bendamustine to induce CLL apoptosis. *Br J Haematol* 2013
201. Yap TA, Yan L, Patnaik A et al. First-in-man clinical trial of the oral pan-AKT inhibitor MK-2206 in patients with advanced solid tumors. *J.Clin.Oncol.* 2011;29:4688-4695.
202. Kondapaka SB, Singh SS, Dasmahapatra GP, Sausville EA, Roy KK. Perifosine, a novel alkylphospholipid, inhibits protein kinase B activation. *Mol.Cancer Ther.* 2003;2:1093-1103.
203. Fu L, Kim YA, Wang X et al. Perifosine inhibits mammalian target of rapamycin signaling through facilitating degradation of major components in the mTOR axis and induces autophagy. *Cancer Res.* 2009;69:8967-8976.
204. Reis-Sobreiro M, Roue G, Moros A et al. Lipid raft-mediated Akt signaling as a therapeutic target in mantle cell lymphoma. *Blood Cancer J.* 2013;3:e118.
205. Friedman DR, Lanasa MC, Davis PH et al. Perifosine treatment in chronic lymphocytic leukemia: results of a phase II clinical trial and in vitro studies. *Leuk.Lymphoma* 2013
206. Vasudevan KM, Barbie DA, Davies MA et al. AKT-independent signaling downstream of oncogenic PIK3CA mutations in human cancer. *Cancer Cell* 2009;16:21-32.
207. Vezina C, Kudelski A, Sehgal SN. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J.Antibiot.(Tokyo)* 1975;28:721-726.
208. Heitman J, Movva NR, Hall MN. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* 1991;253:905-909.
209. Laplante M, Sabatini DM. Regulation of mTORC1 and its impact on gene expression at a glance. *J Cell Sci* 2013;126:1713-1719.
210. Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S et al. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol.Cell* 2006;22:159-168.
211. Sato T, Nakashima A, Guo L, Coffman K, Tamanoi F. Single amino-acid changes that confer constitutive activation of mTOR are discovered in human cancer. *Oncogene* 2010;29:2746-2752.
212. Wagle N, Grabiner BC, Van Allen EM et al. Activating mTOR Mutations in a Patient with an Extraordinary Response on a Phase I Trial of Everolimus and Pazopanib. *Cancer Discov* 2014
213. Benjamin D, Colombi M, Moroni C, Hall MN. Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 2011;10:868-880.
214. Hudes G, Carducci M, Tomczak P et al. Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N.Engl.J.Med.* 2007;356:2271-2281.

215. Fuente A, González G, García-Carbonero I, García-Frade J et al. Efficacy and Safety Of Temsirolimus In Patients With Relapsed Or Refractory Mantle Cell Lymphoma: Results From The Spanish Experience. *Blood* 2013;122:5117.
216. Motzer RJ, Escudier B, Oudard S et al. Phase 3 trial of everolimus for metastatic renal cell carcinoma : final results and analysis of prognostic factors. *Cancer* 2010;116:4256-4265.
217. Baselga J, Campone M, Piccart M et al. Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer. *N.Engl.J.Med.* 2012;366:520-529.
218. Yao JC, Shah MH, Ito T et al. Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors. *N.Engl.J.Med.* 2011;364:514-523.
219. Witzig TE, Reeder CB, LaPlant BR et al. A phase II trial of the oral mTOR inhibitor everolimus in relapsed aggressive lymphoma. *Leukemia* 2011;25:341-347.
220. Renner C, Zinzani PL, Gressin R et al. A multicenter phase II trial (SAKK 36/06) of single-agent everolimus (RAD001) in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *Haematologica* 2012;97:1085-1091.
221. Wang M, Popplewell LL, Collins RH, Jr. et al. Everolimus for patients with mantle cell lymphoma refractory to or intolerant of bortezomib: multicentre, single-arm, phase 2 study. *Br.J.Haematol.* 2014
222. Zent CS, LaPlant BR, Johnston PB et al. The treatment of recurrent/refractory chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma (CLL) with everolimus results in clinical responses and mobilization of CLL cells into the circulation. *Cancer* 2010;116:2201-2207.
223. Spreafico A, Mackay HJ. Current phase II clinical data for ridaforolimus in cancer. *Expert.Opin Investig.Drugs* 2013;22:1485-1493.
224. Rizzieri DA, Feldman E, Dipersio JF et al. A phase 2 clinical trial of deforolimus (AP23573, MK-8669), a novel mammalian target of rapamycin inhibitor, in patients with relapsed or refractory hematologic malignancies. *Clin.Cancer Res.* 2008;14:2756-2762.
225. Hsu PP, Kang SA, Rameseder J et al. The mTOR-regulated phosphoproteome reveals a mechanism of mTORC1-mediated inhibition of growth factor signaling. *Science* 2011;332:1317-1322.
226. Yu Y, Yoon SO, Poulogiannis G et al. Phosphoproteomic analysis identifies Grb10 as an mTORC1 substrate that negatively regulates insulin signaling. *Science* 2011;332:1322-1326.
227. Um SH, Frigerio F, Watanabe M et al. Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature* 2004;431:200-205.
228. O'Reilly KE, Rojo F, She QB et al. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res.* 2006;66:1500-1508.

229. Sun SY, Rosenberg LM, Wang X et al. Activation of Akt and eIF4E survival pathways by rapamycin-mediated mammalian target of rapamycin inhibition. *Cancer Res.* 2005;65:7052-7058.
230. Tzatsos A, Kandrор KV. Nutrients suppress phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling via raptor-dependent mTOR-mediated insulin receptor substrate 1 phosphorylation. *Mol.Cell Biol.* 2006;26:63-76.
231. Choo AY, Yoon SO, Kim SG, Roux PP, Blenis J. Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2008;105:17414-17419.
232. Zeng Z, Shi YX, Tsao T et al. Targeting of mTORC1/2 by the mTOR kinase inhibitor PP242 induces apoptosis in AML cells under conditions mimicking the bone marrow microenvironment. *Blood* 2012;120:2679-2689.
233. Hsieh AC, Costa M, Zollo O et al. Genetic dissection of the oncogenic mTOR pathway reveals druggable addiction to translational control via 4EBP-eIF4E. *Cancer Cell* 2010;17:249-261.
234. Janes MR, Vu C, Mallya S et al. Efficacy of the investigational mTOR kinase inhibitor MLN0128/INK128 in models of B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2013;27:586-594.
235. Gupta M, Hendrickson AE, Yun SS et al. Dual mTORC1/mTORC2 inhibition diminishes Akt activation and induces Puma-dependent apoptosis in lymphoid malignancies. *Blood* 2012;119:476-487.
236. Papadopoulos K, Tabernero J, Markman B et al. Phase I safety, pharmacokinetic and pharmacodynamic study of SAR245409 (XL765), a novel, orally administered PI3K/mTOR inhibitor in patients with advanced solid tumors. *Clin.Cancer Res.* 2014
237. Chiarini F, Fala F, Tazzari PL et al. Dual inhibition of class IA phosphatidylinositol 3-kinase and mammalian target of rapamycin as a new therapeutic option for T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res.* 2009;69:3520-3528.
238. Park S, Chapuis N, Bardet V et al. PI-103, a dual inhibitor of Class IA phosphatidylinositide 3-kinase and mTOR, has antileukemic activity in AML. *Leukemia* 2008;22:1698-1706.
239. Bhatt AP, Bhende PM, Sin SH et al. Dual inhibition of PI3K and mTOR inhibits autocrine and paracrine proliferative loops in PI3K/Akt/mTOR-addicted lymphomas. *Blood* 2010;115:4455-4463.
240. Bhende PM, Park SI, Lim MS, Dittmer DP, Damania B. The dual PI3K/mTOR inhibitor, NVP-BE235, is efficacious against follicular lymphoma. *Leukemia* 2010;24:1781-1784.
241. Chiarini F, Grimaldi C, Ricci F et al. Activity of the novel dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor NVP-BE235 against T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res.* 2010;70:8097-8107.

242. Shortt J, Martin BP, Newbold A et al. Combined inhibition of PI3K-related DNA damage response kinases and mTORC1 induces apoptosis in MYC-driven B-cell lymphomas. *Blood* 2013;121:2964-2974.
243. Wunderle L, Badura S, Lang F et al. Safety and Efficacy Of BEZ235, a Dual PI3-Kinase /mTOR Inhibitor, In Adult Patients With Relapsed Or Refractory Acute Leukemia: Results Of a Phase I Study. *Blood* 2013;122:2675.
244. Muller A, Zang C, Chumduri C et al. Concurrent inhibition of PI3K and mTORC1/mTORC2 overcomes resistance to rapamycin induced apoptosis by down-regulation of Mcl-1 in mantle cell lymphoma. *Int.J.Cancer* 2013;133:1813-1824.
245. Kim A, Park S, Lee JE et al. The dual PI3K and mTOR inhibitor NVP-BEZ235 exhibits anti-proliferative activity and overcomes bortezomib resistance in mantle cell lymphoma cells. *Leuk.Res.* 2012;36:912-920.
246. Civallero M, Cosenza M, Marcheselli L, Pozzi S, Sacchi S. NVP-BEZ235 alone and in combination in mantle cell lymphoma: an effective therapeutic strategy. *Expert.Opin.Investig.Drugs* 2012;21:1597-1606.
247. Baud V, Karin M. Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nat.Rev.Drug Discov.* 2009;8:33-40.
248. Lee DF, Kuo HP, Chen CT et al. IKK beta suppression of TSC1 links inflammation and tumor angiogenesis via the mTOR pathway. *Cell* 2007;130:440-455.
249. Yang DT, Young KH, Kahl BS, Markovina S, Miyamoto S. Prevalence of bortezomib-resistant constitutive NF-kappaB activity in mantle cell lymphoma. *Mol.Cancer* 2008;7:40.
250. Furman RR, Asgary Z, Mascarenhas JO, Liou HC, Schattner EJ. Modulation of NF-kappa B activity and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *J.Immunol.* 2000;164:2200-2206.
251. Lopez-Guerra M, Roue G, Perez-Galan P et al. p65 activity and ZAP-70 status predict the sensitivity of chronic lymphocytic leukemia cells to the selective IkappaB kinase inhibitor BMS-345541. *Clin.Cancer Res.* 2009;15:2767-2776.
252. Roue G, Perez-Galan P, Lopez-Guerra M et al. Selective inhibition of IkappaB kinase sensitizes mantle cell lymphoma B cells to TRAIL by decreasing cellular FLIP level. *J.Immunol.* 2007;178:1923-1930.
253. Greten FR, Arkan MC, Bollrath J et al. NF-kappaB is a negative regulator of IL-1beta secretion as revealed by genetic and pharmacological inhibition of IKKbeta. *Cell* 2007;130:918-931.
254. Rahal R, Frick M, Romero R et al. Pharmacological and genomic profiling identifies NF-kappaB-targeted treatment strategies for mantle cell lymphoma. *Nat.Med.* 2014;20:87-92.
255. Chaturvedi NK, Rajule RN, Shukla A et al. Novel treatment for mantle cell lymphoma including therapy-resistant tumor by NF-kappaB and mTOR dual-targeting approach. *Mol Cancer Ther* 2013;12:2006-2017.

256. Krysov S, Dias S, Paterson A et al. Surface IgM stimulation induces MEK1/2-dependent MYC expression in chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2012;119:170-179.
257. Balmanno K, Cook SJ. Tumour cell survival signalling by the ERK1/2 pathway. *Cell Death Differ* 2009;16:368-377.
258. Meloche S, Pouyssegur J. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene* 2007;26:3227-3239.
259. Zheng Y, Xia Y, Hawke D et al. FAK phosphorylation by ERK primes ras-induced tyrosine dephosphorylation of FAK mediated by PIN1 and PTP-PEST. *Mol Cell* 2009;35:11-25.
260. Xargay-Torrent S, Lopez-Guerra M, Montraveta A et al. Sorafenib inhibits cell migration and stroma-mediated bortezomib resistance by interfering B-cell receptor signaling and protein translation in mantle cell lymphoma. *Clin Cancer Res* 2013;19:586-597.
261. Martelli AM, Evangelisti C, Chappell W et al. Targeting the translational apparatus to improve leukemia therapy: roles of the PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathway. *Leukemia* 2011;25:1064-1079.
262. Memmott RM, Dennis PA. Akt-dependent and -independent mechanisms of mTOR regulation in cancer. *Cell Signal*. 2009;21:656-664.
263. Muzio M, Apollonio B, Scielzo C et al. Constitutive activation of distinct BCR-signaling pathways in a subset of CLL patients: a molecular signature of anergy. *Blood* 2008;112:188-195.
264. Nagy B, Galimberti S, Benedetti E et al. RAF-1 over-expression does condition survival of patients affected by aggressive mantle cell lymphoma. *Leuk Res* 2007;31:1595-1597.
265. Joseph EW, Pratilas CA, Poulikakos PI et al. The RAF inhibitor PLX4032 inhibits ERK signaling and tumor cell proliferation in a V600E BRAF-selective manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:14903-14908.
266. Davies BR, Logie A, McKay JS et al. AZD6244 (ARRY-142886), a potent inhibitor of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase 1/2 kinases: mechanism of action in vivo, pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship, and potential for combination in preclinical models. *Mol Cancer Ther* 2007;6:2209-2219.
267. Carracedo A, Ma L, Teruya-Feldstein J et al. Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *J.Clin.Invest* 2008;118:3065-3074.
268. Di NF, Arena S, Tabernero J et al. Deregulation of the PI3K and KRAS signaling pathways in human cancer cells determines their response to everolimus. *J.Clin.Invest* 2010;120:2858-2866.

269. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646-674.
270. Juin P, Geneste O, Gautier F, Depil S, Campone M. Decoding and unlocking the BCL-2 dependency of cancer cells. *Nat.Rev.Cancer* 2013;13:455-465.
271. Janku F, McConkey DJ, Hong DS, Kurzrock R. Autophagy as a target for anticancer therapy. *Nat.Rev.Clin.Oncol.* 2011;8:528-539.
272. Hanada M, Delia D, Aiello A, Stadtmauer E, Reed JC. bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1993;82:1820-1828.
273. Robertson LE, Plunkett W, McConnell K, Keating MJ, McDonnell TJ. Bcl-2 expression in chronic lymphocytic leukemia and its correlation with the induction of apoptosis and clinical outcome. *Leukemia* 1996;10:456-459.
274. Mills JR, Hippo Y, Robert F et al. mTORC1 promotes survival through translational control of Mcl-1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2008;105:10853-10858.
275. Khoury JD, Medeiros LJ, Rassidakis GZ et al. Expression of Mcl-1 in mantle cell lymphoma is associated with high-grade morphology, a high proliferative state, and p53 overexpression. *J.Pathol.* 2003;199:90-97.
276. Pepper C, Lin TT, Pratt G et al. Mcl-1 expression has in vitro and in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and is associated with other poor prognostic markers. *Blood* 2008;112:3807-3817.
277. Kitada S, Andersen J, Akar S et al. Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with In vitro and In vivo chemoresponses. *Blood* 1998;91:3379-3389.
278. Tagawa H, Karnan S, Suzuki R et al. Genome-wide array-based CGH for mantle cell lymphoma: identification of homozygous deletions of the proapoptotic gene BIM. *Oncogene* 2005;24:1348-1358.
279. Mestre-Escorihuela C, Rubio-Moscardo F, Richter JA et al. Homozygous deletions localize novel tumor suppressor genes in B-cell lymphomas. *Blood* 2007;109:271-280.
280. Tse C, Shoemaker AR, Adickes J et al. ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res.* 2008;68:3421-3428.
281. Yecies D, Carlson NE, Deng J, Letai A. Acquired resistance to ABT-737 in lymphoma cells that up-regulate MCL-1 and BFL-1. *Blood* 2010;115:3304-3313.
282. Wilson WH, O'Connor OA, Czuczman MS et al. Navitoclax, a targeted high-affinity inhibitor of BCL-2, in lymphoid malignancies: a phase 1 dose-escalation study of safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and antitumour activity. *Lancet Oncol.* 2010;11:1149-1159.
283. Roberts AW, Seymour JF, Brown JR et al. Substantial susceptibility of chronic lymphocytic leukemia to BCL2 inhibition: results of a phase I study of navitoclax in patients with relapsed or refractory disease. *J.Clin.Oncol.* 2012;30:488-496.

284. Zhang H, Nimmer PM, Tahir SK et al. Bcl-2 family proteins are essential for platelet survival. *Cell Death.Differ.* 2007;14:943-951.
285. Souers AJ, Levenson JD, Boghaert ER et al. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat.Med.* 2013;19:202-208.
286. Vandenberg CJ, Cory S. ABT-199, a new Bcl-2-specific BH3 mimetic, has in vivo efficacy against aggressive Myc-driven mouse lymphomas without provoking thrombocytopenia. *Blood* 2013;121:2285-2288.
287. Khaw SL, Merino D, Anderson MA et al. Both leukaemic and normal peripheral B lymphoid cells are highly sensitive to the selective pharmacological inhibition of pro-survival Bcl-2 with ABT-199. *Leukemia* 2014
288. Davids MS, Seymour JF, Gerecitano JF et al. Updated results of a phase I first-in-human study of the BCL-2 inhibitor ABT-199 (GDC-0199) in patients with relapsed/refractory non-Hodgkin lymphoma (NHL). *ASCO Meeting Abstracts* 2013;31:8520.
289. Seymour JF, Davids MS, Pagel JM et al. Updated results of a phase I first-in-human study of the BCL-2 inhibitor ABT-199 (GDC-0199) in patients with relapsed/refractory (R/R) chronic lymphocytic leukemia (CLL). *ASCO Meeting Abstracts* 2013;31:7018.
290. Choi AM, Ryter SW, Levine B. Autophagy in human health and disease. *N.Engl.J.Med.* 2013;368:1845-1846.
291. Kuma A, Mizushima N. Physiological role of autophagy as an intracellular recycling system: with an emphasis on nutrient metabolism. *Semin.Cell Dev.Biol.* 2010;21:683-690.
292. Baxt LA, Garza-Mayers AC, Goldberg MB. Bacterial subversion of host innate immune pathways. *Science* 2013;340:697-701.
293. Kim HJ, Lee S, Jung JU. When autophagy meets viruses: a double-edged sword with functions in defense and offense. *Semin.Immunopathol.* 2010;32:323-341.
294. Lamark T, Johansen T. Aggrephagy: selective disposal of protein aggregates by macroautophagy. *Int.J.Cell Biol.* 2012;2012:736905.
295. Narendra D, Tanaka A, Suen DF, Youle RJ. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J.Cell Biol.* 2008;183:795-803.
296. Hayashi-Nishino M, Fujita N, Noda T et al. A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat.Cell Biol.* 2009;11:1433-1437.
297. Yla-Anttila P, Vihinen H, Jokitalo E, Eskelinen EL. 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy* 2009;5:1180-1185.

298. Lamb CA, Yoshimori T, Tooze SA. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2013;14:759-774.
299. Nazio F, Strappazon F, Antonioli M et al. mTOR inhibits autophagy by controlling ULK1 ubiquitylation, self-association and function through AMBRA1 and TRAF6. *Nat.Cell Biol.* 2013;15:406-416.
300. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat.Cell Biol.* 2011;13:132-141.
301. Russell RC, Tian Y, Yuan H et al. ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat.Cell Biol.* 2013;15:741-750.
302. Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 2012;8:445-544.
303. Liang XH, Jackson S, Seaman M et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 1999;402:672-676.
304. Yang ZJ, Chee CE, Huang S, Sinicrope FA. The role of autophagy in cancer: therapeutic implications. *Mol.Cancer Ther.* 2011;10:1533-1541.
305. Wang RC, Wei Y, An Z et al. Akt-mediated regulation of autophagy and tumorigenesis through Beclin 1 phosphorylation. *Science* 2012;338:956-959.
306. Strappazon F, Vietri-Rudan M, Campello S et al. Mitochondrial BCL-2 inhibits AMBRA1-induced autophagy. *EMBO J.* 2011;30:1195-1208.
307. Erlich S, Mizrachy L, Segev O et al. Differential interactions between Beclin 1 and Bcl-2 family members. *Autophagy.* 2007;3:561-568.
308. Mathew R, Karp CM, Beaudoin B et al. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell* 2009;137:1062-1075.
309. Mathew R, Kongara S, Beaudoin B et al. Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes Dev.* 2007;21:1367-1381.
310. Yuan J, Kroemer G. Alternative cell death mechanisms in development and beyond. *Genes Dev* 2010;24:2592-2602.
311. Denton D, Nicolson S, Kumar S. Cell death by autophagy: facts and apparent artefacts. *Cell Death Differ* 2012;19:87-95.
312. Elgendy M, Sheridan C, Brumatti G, Martin SJ. Oncogenic Ras-induced expression of Noxa and Beclin-1 promotes autophagic cell death and limits clonogenic survival. *Mol.Cell* 2011;42:23-35.
313. Rubinstein AD, Eisenstein M, Ber Y, Bialik S, Kimchi A. The autophagy protein Atg12 associates with antiapoptotic Bcl-2 family members to promote mitochondrial apoptosis. *Mol.Cell* 2011;44:698-709.
314. Radoshevich L, Murrow L, Chen N et al. ATG12 conjugation to ATG3 regulates mitochondrial homeostasis and cell death. *Cell* 2010;142:590-600.
315. Marino G, Niso-Santano M, Baehrecke EH, Kroemer G. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15:81-94.

316. Deretic V. Autophagy: an emerging immunological paradigm. *J.Immunol.* 2012;189:15-20.
317. Michaud M, Martins I, Sukkurwala AQ et al. Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. *Science* 2011;334:1573-1577.
318. Kroemer G, Marino G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell* 2010;40:280-293.
319. Amaravadi RK, Yu D, Lum JJ et al. Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma. *J.Clin.Invest* 2007;117:326-336.
320. Amaravadi RK, Lippincott-Schwartz J, Yin XM et al. Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment. *Clin.Cancer Res.* 2011;17:654-666.
321. Alinari L, Baiocchi RA, Praetorius-Ibba M. FTY720-induced blockage of autophagy enhances anticancer efficacy of milatuzumab in mantle cell lymphoma: is FTY720 the next autophagy-blocking agent in lymphoma treatment? *Autophagy* 2012;8:416-417.
322. Cuzick J, DeCensi A, Arun B et al. Preventive therapy for breast cancer: a consensus statement. *Lancet Oncol.* 2011;12:496-503.
323. Crazzolara R, Bradstock KF, Bendall LJ. RAD001 (Everolimus) induces autophagy in acute lymphoblastic leukemia. *Autophagy.* 2009;5:727-728.
324. Yazbeck VY, Buglio D, Georgakis GV et al. Temsirolimus downregulates p21 without altering cyclin D1 expression and induces autophagy and synergizes with vorinostat in mantle cell lymphoma. *Exp.Hematol.* 2008;36:443-450.
325. Malik SA, Orhon I, Morselli E et al. BH3 mimetics activate multiple pro-autophagic pathways. *Oncogene* 2011;30:3918-3929.
326. Sharma A, Singh K, Mazumder S et al. BECN1 and BIM interactions with MCL-1 determine fludarabine resistance in leukemic B cells. *Cell Death.Dis.* 2013;4:e628.
327. Shi WY, Xiao D, Wang L et al. Therapeutic metformin/AMPK activation blocked lymphoma cell growth via inhibition of mTOR pathway and induction of autophagy. *Cell Death.Dis.* 2012;3:e275.
328. DeCensi A, Puntoni M, Goodwin P et al. Metformin and cancer risk in diabetic patients: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Prev.Res.(Phila)* 2010;3:1451-1461.
329. Townsend KN, Hughson LR, Schlie K et al. Autophagy inhibition in cancer therapy: metabolic considerations for antitumor immunity. *Immunol.Rev.* 2012;249:176-194.

330. Foukas LC, Berenjano IM, Gray A, Khwaja A, Vanhaesebroeck B. Activity of any class IA PI3K isoform can sustain cell proliferation and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:11381-11386.
331. Witzig TE, Geyer SM, Ghobrial I et al. Phase II trial of single-agent temsirolimus (CCI-779) for relapsed mantle cell lymphoma. *J Clin.Oncol.* 2005;23:5347-5356.
332. Fu Z, Tindall DJ. FOXOs, cancer and regulation of apoptosis. *Oncogene* 2008;27:2312-2319.
333. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 1999;96:857-868.
334. Yang JY, Hung MC. A new fork for clinical application: targeting forkhead transcription factors in cancer. *Clin.Cancer Res.* 2009;15:752-757.
335. Stahl M, Dijkers PF, Kops GJ et al. The forkhead transcription factor FoxO regulates transcription of p27Kip1 and Bim in response to IL-2. *J.Immunol.* 2002;168:5024-5031.
336. Essafi A, Fernandez de MS, Hassen YA et al. Direct transcriptional regulation of Bim by FoxO3a mediates STI571-induced apoptosis in Bcr-Abl-expressing cells. *Oncogene* 2005;24:2317-2329.
337. Sunters A, Fernandez de MS, Stahl M et al. FoxO3a transcriptional regulation of Bim controls apoptosis in paclitaxel-treated breast cancer cell lines. *J.Biol.Chem.* 2003;278:49795-49805.
338. Essafi M, Baudot AD, Mouska X et al. Cell-penetrating TAT-FOXO3 fusion proteins induce apoptotic cell death in leukemic cells. *Mol Cancer Ther* 2011;10:37-46.
339. Iglesias-Serret D, de FM, Santidrian AF et al. Regulation of the proapoptotic BH3-only protein BIM by glucocorticoids, survival signals and proteasome in chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* 2007;21:281-287.
340. Melarangi T, Zhuang J, Lin K et al. Glucocorticoid resistance in chronic lymphocytic leukaemia is associated with a failure of upregulated Bim/Bcl-2 complexes to activate Bax and Bak. *Cell Death Dis.* 2012;3:e372.
341. Alonso R, Lopez-Guerra M, Upshaw R et al. Forodesine has high antitumor activity in chronic lymphocytic leukemia and activates p53-independent mitochondrial apoptosis by induction of p73 and BIM. *Blood* 2009;114:1563-1575.
342. Paterson A, Mockridge CI, Adams JE et al. Mechanisms and clinical significance of BIM phosphorylation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2012;119:1726-1736.
343. Davids MS, Deng J, Wiestner A et al. Decreased mitochondrial apoptotic priming underlies stroma-mediated treatment resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2012;120:3501-3509.

344. Ng KP, Hillmer AM, Chuah CT et al. A common BIM deletion polymorphism mediates intrinsic resistance and inferior responses to tyrosine kinase inhibitors in cancer. *Nat Med* 2012;18:521-528.
345. Ten HE, Burger J. Molecular Pathways: Targeting the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia- focus on the B cell receptor. *Clin.Cancer Res.* 2013
346. Cheson BD, Byrd JC, Rai KR et al. Novel targeted agents and the need to refine clinical end points in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2012;30:2820-2822.
347. Haritunians T, Mori A, O'Kelly J et al. Antiproliferative activity of RAD001 (everolimus) as a single agent and combined with other agents in mantle cell lymphoma. *Leukemia* 2007;21:333-339.
348. Meric-Bernstam F, Akcakanat A, Chen H et al. PIK3CA/PTEN mutations and Akt activation as markers of sensitivity to allosteric mTOR inhibitors. *Clin.Cancer Res.* 2012;18:1777-1789.
349. Altman JK, Szilard A, Goussetis DJ et al. Autophagy is a survival mechanism of acute myeloid leukemia precursors during dual mTORC2/mTORC1 targeting. *Clin Cancer Res* 2014
350. Fan QW, Cheng C, Hackett C et al. Akt and autophagy cooperate to promote survival of drug-resistant glioma. *Sci.Signal.* 2010;3:ra81.
351. Ansell SM, Tang H, Kurtin PJ et al. Temsirolimus and rituximab in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma: a phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2011;12:361-368.
352. Smith SM, van BK, Karrison T et al. Temsirolimus has activity in non-mantle cell non-Hodgkin's lymphoma subtypes: The University of Chicago phase II consortium. *J.Clin.Oncol.* 2010;28:4740-4746.
353. Vogt PK, Hart JR. PI3K and STAT3: a new alliance. *Cancer Discov.* 2011;1:481-486.
354. Baran-Marszak F, Boukhari M, Harel S et al. Constitutive and B-cell receptor-induced activation of STAT3 are important signaling pathways targeted by bortezomib in leukemic mantle cell lymphoma. *Haematologica* 2010;95:1865-1872.
355. Nakao T, Kim S, Ohta K et al. Role of mitogen-activated protein kinase family in serum-induced leukaemia inhibitory factor and interleukin-6 secretion by bone marrow stromal cells. *Br.J.Pharmacol.* 2002;136:975-984.
356. Natoli A, Lupertz R, Merz C et al. Targeting the IL-4/IL-13 signaling pathway sensitizes Hodgkin lymphoma cells to chemotherapeutic drugs. *Int.J.Cancer* 2013;133:1945-1954.
357. Calvo KR, Dabir B, Kovach A et al. IL-4 protein expression and basal activation of Erk in vivo in follicular lymphoma. *Blood* 2008;112:3818-3826.

358. Wang L, Zhao Y, Qian J et al. Toll-like receptor-4 signaling in mantle cell lymphoma: effects on tumor growth and immune evasion. *Cancer* 2013;119:782-791.
359. Ruan J, Hajjar K, Rafii S, Leonard JP. Angiogenesis and antiangiogenic therapy in non-Hodgkin's lymphoma. *Ann.Oncol.* 2009;20:413-424.
360. Fruchon S, Kheirallah S, Al ST et al. Involvement of the Syk-mTOR pathway in follicular lymphoma cell invasion and angiogenesis. *Leukemia* 2012;26:795-805.
361. Valdembri D, Serini G, Vacca A, Ribatti D, Bussolino F. In vivo activation of JAK2/STAT-3 pathway during angiogenesis induced by GM-CSF. *FASEB J.* 2002;16:225-227.
362. Juric D, Baselga J. Tumor genetic testing for patient selection in phase I clinical trials: the case of PI3K inhibitors. *J Clin Oncol* 2012;30:765-766.
363. Walsh K, McKinney MS, Love C et al. PAK1 mediates resistance to PI3K inhibition in lymphomas. *Clin.Cancer Res.* 2013;19:1106-1115.
364. Willimott S, Beck D, Ahearne MJ, Adams VC, Wagner SD. Cap-translation inhibitor, 4EGI-1, restores sensitivity to ABT-737 apoptosis through cap-dependent and -independent mechanisms in chronic lymphocytic leukemia. *Clin.Cancer Res.* 2013;19:3212-3223.
365. Lim S, Saw TY, Zhang M et al. Targeting of the MNK-eIF4E axis in blast crisis chronic myeloid leukemia inhibits leukemia stem cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:E2298-E2307.
366. Marzec M, Liu X, Wysocka M et al. Simultaneous inhibition of mTOR-containing complex 1 (mTORC1) and MNK induces apoptosis of cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) cells. *PLoS.One.* 2011;6:e24849.
367. Chen LS, Redkar S, Bearss D, Wierda WG, Gandhi V. Pim kinase inhibitor, SGI-1776, induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2009;114:4150-4157.
368. Yang Q, Chen LS, Neelapu SS et al. Transcription and translation are primary targets of Pim kinase inhibitor SGI-1776 in mantle cell lymphoma. *Blood* 2012;120:3491-3500.
369. Gomez-Abad C, Pisonero H, Blanco-Aparicio C et al. PIM2 inhibition as a rational therapeutic approach in B-cell lymphoma. *Blood* 2011;118:5517-5527.
370. Brown JR, Barrientos JC, Barr PM, Flinn I et al. Ibrutinib In Combination With Bendamustine and Rituximab Is Active and Tolerable In Patients With Relapsed/Refractory CLL/SLL: Final Results Of a Phase 1b Study. *Blood* 2013;122:525.
371. Ribrag V, Karlin L, Terriou L, Gastinne T et al. Phase 1b Study Of Everolimus (RAD001), a mTORC1 Inhibitor In Combination With Rituximab (R), In Patients With Relapsed Or Refractory Indolent CD20+ Lymphomas Or Transformed Aggressive CD20+ Lymphomas. *Blood* 2013;122:5128.

372. Reeder C, Dueck AC, Gano K, Nichols C et al. A Phase I/II Combination Of RAD001 (Everolimus) and Lenalidomide For Relapsed Lymphoid Malignancy: Phase I Results. *Blood* 2013;122:4350.
373. Gentry LR, Martin TD, Der CJ. Mechanisms of targeted therapy resistance take a de-TOR. *Cancer Cell* 2013;24:284-286.
374. Shimizu T, Tolcher AW, Papadopoulos KP et al. The clinical effect of the dual-targeting strategy involving PI3K/AKT/mTOR and RAS/MEK/ERK pathways in patients with advanced cancer. *Clin.Cancer Res.* 2012;18:2316-2325.
375. Rahmani M, Aust MM, Attkisson E et al. Dual inhibition of Bcl-2 and Bcl-xL strikingly enhances PI3K inhibition-induced apoptosis in human myeloid leukemia cells through a GSK3- and Bim-dependent mechanism. *Cancer Res* 2013;73:1340-1351.
376. Schwamb J, Feldhaus V, Baumann M et al. B-cell receptor triggers drug sensitivity of primary CLL cells by controlling glucosylation of ceramides. *Blood* 2012;120:3978-3985.
377. Kovacs JR, Li C, Yang Q et al. Autophagy promotes T-cell survival through degradation of proteins of the cell death machinery. *Cell Death Differ* 2012;19:144-152.
378. Solomon VR, Lee H. Chloroquine and its analogs: a new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies. *Eur.J Pharmacol* 2009;625:220-233.
379. Torgersen ML, Engedal N, Boe SO, Hokland P, Simonsen A. Targeting autophagy potentiates the apoptotic effect of histone deacetylase inhibitors in t(8;21) AML cells. *Blood* 2013;122:2467-2476.



Annexos

Annex 1: Ressenya del segon article

Del segon treball d'aquesta tesi "Contrarestar l'autofàgia supera la resistència a everolimus en el limfoma de cèl·lules del mantell", se n'ha publicat un comentari a la revista *Autophagy*, titulat "L'autofàgia controla l'activitat d'everolimus (RAD001) en el limfoma de cèl·lules del mantell".

Autophagy controls everolimus (RAD001) activity in mantle cell lymphoma

Laia Rosich, Dolors Colomer and Gaël Roué*

Hemato-oncology Department; Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS); Hematopathology Unit; Hospital Clínic; Barcelona, Spain

Mantle cell lymphoma (MCL) is an aggressive neoplasm, which lacks effective therapy. The mechanistic target of rapamycin (MTOR) kinase inhibitor everolimus (RAD001) has shown activity in preclinical and clinical models of MCL, despite the fact that its mechanism of action has not been fully elucidated. We found that everolimus activity in MCL cells is closely linked to AKT phosphorylation status, and that the prevention of AKT rephosphorylation upon everolimus treatment by means of a selective AKT inhibitor, greatly enhances everolimus activity. Furthermore, our data show that an accumulation of autophagic vacuoles correlates with a lack of efficacy of dual AKT-MTOR targeting and that the complete therapeutic potential of this strategy can be restored by ATG gene selective knockdown or secondary inhibition of autolysosome formation by hydroxychloroquine. We thus demonstrated for the first time that the use of an autophagy inhibitor can overcome resistance to the combination of MTOR and AKT inhibitors in MCL cell lines and primary samples, demonstrating the pro-survival role of autophagy in AKT-MTOR compromised cells, and pointing out some potential opportunities using this triple combinational strategy in hematological malignancies.

proliferation, and/or induces the death of cells bearing mutations. Furthermore, autophagy can also provide protection from cell death in cells exposed to different stress inducers and common chemotherapeutics in several cancer models. Therefore, the impact of autophagy induction on the efficacy of antitumoral agents can be highly variable and cell type- and treatment-dependent. This evolutionarily conserved role of autophagy has stimulated research to determine whether the modulation of this phenomenon may interfere with cancer cell response to cytotoxic therapy. Most efforts have focused on using autophagy inhibitors in tumor cell lines with high levels of basal autophagy or in conjunction with agents that directly stimulate autophagy signaling pathways such as MTOR inhibitors or dual PI3K-MTOR inhibitors.

Among the cancer models that may directly benefit from targeting the constitutively activated PI3K-AKT-MTOR signaling pathway, are the majority of B-cell neoplasms, and especially mantle cell lymphoma. The ability of various rapalogs to counteract MTOR activity by targeting MTORC1 complexes has been evaluated in both clinical and preclinical studies in MCL, showing a moderate success as monotherapy with mild toxic effects, and granting the approval of temsirolimus (CCI-779) by the European Medicines Agency (EMA) for the treatment of relapsed and refractory MCL patients. However, *in vitro* studies have suggested that the effectiveness of these agents may be stifled in part by strong MTORC1-dependent negative feedback loops that become inactive upon

Keywords: mechanistic target of rapamycin, AKT, everolimus, mantle cell lymphoma, autophagy, survival

Submitted: 09/26/12

Revised: 10/04/12

Accepted: 10/08/12

<http://dx.doi.org/10.4161/auto.22483>

*Correspondence to: Gaël Roué;
Email: groue@clinic.ub.es

Punctum to: Rosich L, Xargay-Torrent S, López-Guerra M, Campo E, Colomer D, Roué G. Counteracting autophagy overcomes resistance to everolimus in mantle cell lymphoma. *Clin Cancer Res* 2012; 18:5278–89; PMID:22879389; <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0351>

The precise role that autophagy plays in cancer development, disease progression, and the response to anticancer therapies, is controversial. At one level, autophagy has been suggested to function as a tumor suppressor pathway that prevents cancer development, because it prevents the

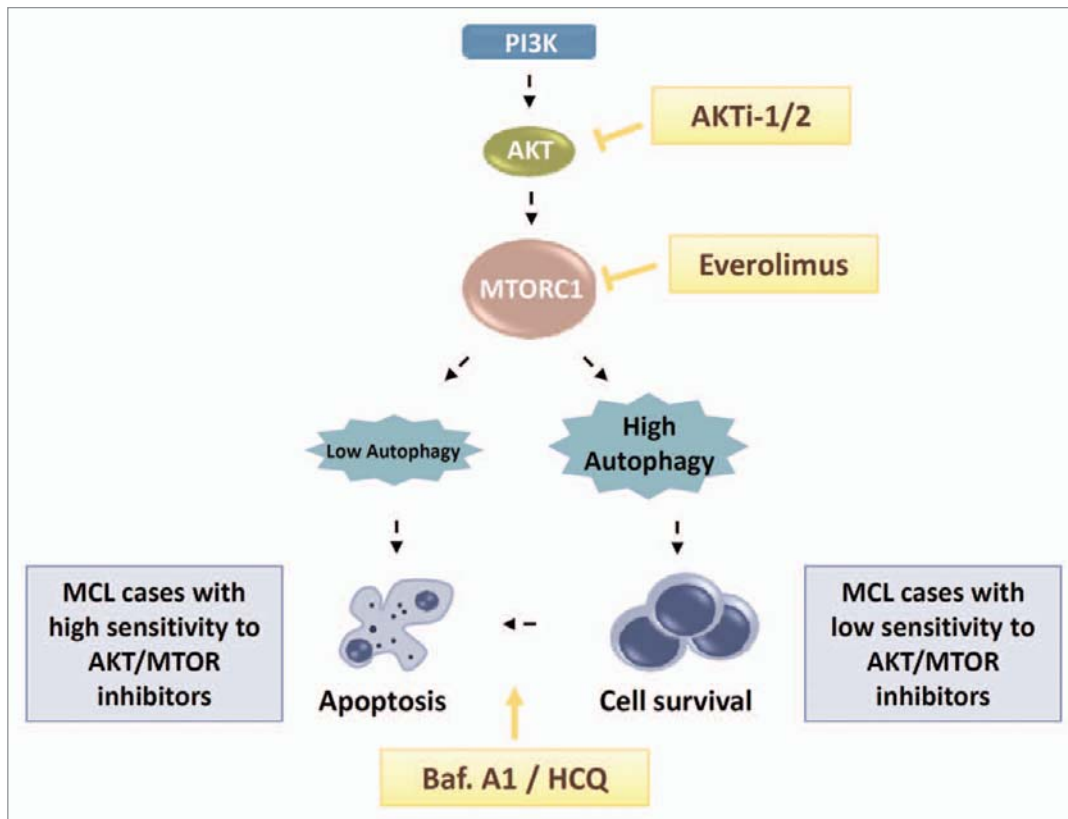


Figure 1. AKT-MTOR and autophagy triple targeting as an effective antitumoral therapy in MCL. Treatment with AKTi-1/2, an isoselective AKT inhibitor, prevents AKT rephosphorylation upon everolimus-mediated inhibition of MTORC1, thus enhancing the activity of the rapalog in MCL cells. However, the degree of autophagy induced by dual MTOR-AKT inhibition determines the fate of the cells, which can undergo either apoptotic cell death or survival. In low-responsive everolimus-AKTi-1/2 MCL cells, pro-survival autophagy can be counteracted by autophagy inhibitors such as bafilomycin A₁ (Baf. A1) or hydroxychloroquine (HCQ), thus restoring the cytotoxic potential of MTOR-AKT targeting.

MTORC1 inhibition, paradoxically leading to survival-promoting events like the activation of AKT. Among the possible mechanisms related to resistance to MTORC1 inhibition, activation of autophagic processing has also been observed some years ago in MCL cells exposed to temsirolimus.

In our recent study, aimed to characterize the molecular bases of sensitivity/resistance to everolimus (RAD001) in MCL, we showed that the development of cell resistance to dual targeting of AKT and MTOR by means of an isoselective AKT inhibitor and everolimus, respectively, relies on the degree of autophagy induction. Indeed, while everolimus induces a tumor-selective, dose-dependent cytotoxicity in the majority of MCL cases, related to G₁ cell cycle arrest and rapid downregulation of the MTOR downstream targets phospho-RPS6 and phospho-EIF4EBP1, a rephosphorylation of AKT at Ser473 presumably linked to the activation of an

MTORC1-dependent feedback loop, may limit the efficacy of everolimus. The full activity of the rapalog requires its combination with an isoselective AKT inhibitor (AKTi-1/2) for complete AKT-MTOR axis inhibition and synergistic antitumoral activity. However, we observed that those MCL samples that are weak responders to everolimus as a single agent still harbor a high viability rate despite the complete AKT-MTOR axis inhibition, in accord with a previous observation in follicular lymphoma. As accumulating evidence suggests that autophagy is one of the major processes functionally involved in cancer cell survival after AKT and MTOR inhibitor exposure, we performed the quantification of autophagy by western blot, flow cytometry and immunofluorescence assays, and found an increase in LC3B-II levels and the accumulation of autolysosomes in cells resistant to this combination therapy. We further demonstrated that autophagy controls the MCL

response to MTOR-AKT inhibitors, as the triple knockdown of *ATG7*, *ATG5* and *ATG3*, allows MCL cells to undergo apoptosis upon exposure to the combination.

In the clinic, the blockers of autophagosome-lysosome fusion hydroxychloroquine and chloroquine are being tested in a number of trials in patients with distinct hematological malignancies, such as multiple myeloma (in combination with the proteasome inhibitor bortezomib) or in chronic myeloid leukemia (in combination with the HDAC inhibitor vorinostat), but no data on their efficacy and safety in aggressive lymphomas like MCL are available. We tested this inhibitor for the first time in MCL primary cultures and we found that the addition of hydroxychloroquine to everolimus-AKTi-1/2 treatment allows the complete processing of LC3B and the full activation of the intrinsic apoptotic program in MCL cells, as demonstrated by mitochondrial depolarization, ROS production, phosphatidylserine

exposure and CASP3-CASP7 activity (Fig. 1).

Thus, these results provide the proof-of-principle and rationale for further clinical evaluation of AKT-MTOR and autophagy triple targeting in MCL patients, and offer a glimpse of the potential opportunities that this combinational

strategy might hold for the treatment of B-cell neoplasms.

Acknowledgments

This work was supported by Fondo de Investigación Sanitaria (PI09/0060; to G.R.), Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF 09/9503; to D.C.), Redes Temáticas

de Investigación Cooperativa de Cáncer from the Instituto de Salud Carlos III (RED 2006-20-014 to D.C.) and Generalitat de Catalunya (2009SGR967 to D.C.). L.R. is recipient of a predoctoral fellowship from IDIBAPS. This work was performed, in part, at the Esther Koplowitz Center, Barcelona.

Annex 2: Presentació en congressos dels treballs d'aquesta tesi

Rosich L, Roué G, López-Guerra M, Campo E i Colomer D.

Antiproliferative activity of everolimus in mantle cell lymphoma.

Tipus de participació: Pòster

Congrés: *Cell death mechanisms and cancer therapy. American Association for Cancer Research (AACR).* 1-4 Febrer 2010, San Diego, CA, EUA.

Rosich L, Roué G, Xargay-Torrent S, López-Guerra M, Campo E i Colomer D.

Molecular bases of everolimus antiproliferative activity in mantle cell lymphoma.

Tipus de participació: Pòster

Congrés: *22nd EORTC (European Organization for Research and Treatment of Cancer)-NCI (National Cancer Institute)-AACR symposium on "Molecular targets and cancer therapeutics".* 16-19 Novembre 2010, Berlín, Alemanya.

Rosich L, Roué G, Xargay-Torrent S, López-Guerra M, Campo E i Colomer D.

Rational combination studies of everolimus in mantle cell lymphoma.

Tipus de participació: Pòster

Congrés: *An AACR special conference "Targeting PI3K/mTOR signaling in cancer".* 24-27 Febrer 2011, San Francisco, CA, EUA.

Rosich L, Xargay-Torrent S, López-Guerra M, Campo E, Roué G i Colomer D.

Counteracting autophagy allows to overcome resistance to the mTOR inhibitor everolimus in mantle cell lymphoma

Tipus de participació: Pòster

Congrés: *AACR-NCI-EORTC Molecular Targets and Cancer Therapeutics Conference.* 12-16 Novembre 2011, San Francisco, CA, EUA.

Rosich L, Xargay-Torrent S, López-Guerra M, Campo E, Colomer D i Roué G.

Autophagy inhibition sensitizes mantle cell lymphoma cells to everolimus.

Tipus de participació: Pòster

Congrés: 22nd Biennial EACR (European Association for Cancer Research) Congress. 7-10 Juliol 2012, Barcelona.

Rosich L, Xargay-Torrent S, López-Guerra M, Campo E, Colomer D i Roué G.

Counteracting autophagy overcomes resistance to everolimus in mantle cell lymphoma.

Tipus de participació: Oral

Congrés: III Encuentro Científico de Jóvenes Investigadores de la Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC). 19-20 Novembre 2012, Barcelona.

Rosich L, Saborit-Villarroya I, López-Guerra M, Xargay-Torrent S, Montraveta A, Aymerich M, Villamor N, Campo E, Pérez-Galán P, Roué G i Colomer D.

NVP-BKM120 decreases cell survival and antagonizes resistance signals derived from protective tissue microenvironment by interfering with the Akt/FoxO3a/Bim axis in chronic lymphocytic leukemia

Tipus de participació: Pòster

Congrés: AACR Annual Meeting 2013. 6-10 Abril 2013, Washington, DC, EUA.

Rosich L, Saborit-Villarroya I, López-Guerra M, Xargay-Torrent S, Montraveta A, Aymerich M, Villamor N, Campo E, Pérez-Galán P, Roué G i Colomer D.

The phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor NVP-BKM120 overcomes resistance signals derived from microenvironment by regulating the Akt/FoxO3a/Bim axis in chronic lymphocytic leukemia cells

Tipus de participació: Pòster

Congrés: VIIIth Annual CLL Young Investigators' Meeting and XV International Workshop on CLL, 8-11 Setembre 2013, Colònia, Alemanya.

Annex 3: Publicacions en col·laboració

Teràpies que indueixen mort cel·lular en neoplàsies B limfoides

Saborit-Villarroya I, Roué G, López-Guerra M, Alonso R, Xargay-Torrent S, **Rosich L**, Colomer D.

Curr Drug Targets. 2010 Jul;11(7):769-80.

Resum

La mort cel·lular programada, associada generalment amb el terme apoptosi, és un programa intracel·lular integrat que juga un paper crític en l'homeòstasi dels teixits limfoides. Les alteracions d'aquest procés altament regulat són una característica comuna de moltes neoplàsies limfoides, facilitant l'evasió tumoral als agents quimioterapèutics tradicionals, que tenen per objectiu principal induir la mort cel·lular tumoral. En els últims anys, s'ha fet un progrés enorme en el coneixement dels senyals desregulats que poden conduir a l'apoptosi inefectiva en els tumors B limfoides. Conseqüentment, s'han dissenyat noves estratègies per a modular molècules clau de les decisions de vida i mort. S'estan validant nombroses noves aproximacions i algunes d'elles han progressat a assajos clínics o han estat aprovades en temps rècord. En aquesta revisió ens centrem en aquelles teràpies actuals que han demostrat induir mort cel·lular en neoplàsies B limfoides de forma eficient, ja sigui actuant directament sobre la maquinària apoptòtica intracel·lular o bé, modulant els diferents factors implicats en la seva regulació.

L'inhibidor d'HSP90, IPI-504, supera la resistència a bortezomib en el limfoma de cèl·lules del mantell *in vitro* i *in vivo* a través de la disminució de la xaperona de supervivència del reticle endoplasmàtic BiP/Grp78.

Roué G, Pérez-Galán P, Mozos A, López-Guerra M, Xargay-Torrent S, Rosich L, Saborit-Villarroya I, Normant E, Campo E, Colomer D.

Blood. 2011 Jan 27;117(4):1270-9.

Resum

Tot i la introducció prometedora de l'inhibidor de proteasoma bortezomib en el tractament del limfoma de cèl·lules del mantell, no tots els pacients responen a la teràpia, i sovint apareixen resistències després del tractament inicial. Mitjançant l'anàlisi d'un conjunt de 18 mostres de MCL, incloent-hi línies cel·lulars amb resistència a bortezomib constitutiva o induïda, vam trobar una elevada correlació entre la pèrdua de sensibilitat a l'inhibidor de proteasoma i l'increment de la xaperona de supervivència BiP/Grp78. L'estabilització de BiP/Grp78 a nivell post-transcripcional era deguda a un increment de l'activitat xaperona de la *Heat Shock Protein of 90kDa* (HSP90). En les cèl·lules resistents al bortezomib, tant el silenciament de BiP/Grp78 com el pretractament de les cèl·lules amb l'inhibidor d'HSP90, IPI-504, conduïa a la inducció d'apoptosi de forma sinèrgica en combinació amb bortezomib. L'exposició de les cèl·lules a la combinació IPI-504-bortezomib provocava la dissociació dels complexos d'HSP90/BiP, comportant l'eliminació de BiP/Grp78, la inhibició de la resposta a proteïnes mal plegades (UPR; *Unfolded Protein Response*) i la despolarització de la membrana mitocondrial a través de NOXA. La combinació IPI-504-bortezomib també va evitar l'acumulació de BiP/Grp78, promovent l'apoptosi i inhibint el creixement dels tumors resistents a bortezomib en un model de MCL en ratolí xenotransplantat. Aquests resultats suggereixen que inhibir l'activació de UPR a través d'HSP90 pot esdevenir un model atractiu per al disseny de noves teràpies combinatòries basades en bortezomib per al MCL.

L'apoptosi induïda per vorinostat en el limfoma de cèl·lules del mantell és deguda a l'acetilació dels promotors dels gens proapoptòtics BH3-only

Xargay-Torrent S, López-Guerra M, Saborit-Villarroya I, Rosich L, Campo E, Roué G, Colomer D.

Clin Cancer Res. 2011 Jun 15;17(12):3956-68

Resum

El limfoma de cèl·lules del mantell és una neoplàsia agressiva de cèl·lula B amb un pronòstic generalment desfavorable, per a la qual les teràpies actuals tenen una eficàcia limitada. El vorinostat és un inhibidor de les desacetilases d'histones (HDACi) que ha estat aprovat per al tractament del limfoma cutani de cèl·lula T. El nostre objectiu va ser descriure el mecanisme molecular mitjançant el qual el vorinostat indueix apoptosi en el MCL, amb especial èmfasi en el paper de les proteïnes proapoptòtiques BH3-only. El vorinostat va inhibir l'activitat desacetilasa d'histones i va activar la via mitocondrial d'apoptosi de forma selectiva per les cèl·lules tumorals, constatat amb els canvis conformacionals de BAX i BAK, despolarització mitocondrial, la generació d'espècies reactives d'oxigen, i la subseqüent mort cel·lular caspasa-dependent. Aquest fenomen estava lligat a la hiperacetilació d'H4 en les regions promotores i a la consegüent activació transcripcional dels gens proapoptòtics BH3-only *BIM*, *BMF* i *NOXA*. El silenciament selectiu d'aquestes tres proteïnes va rescatar les cèl·lules de l'apoptosi induïda per vorinostat. A més, el vorinostat va augmentar l'activitat del BH3-mimètic ABT-263 en cèl·lules de MCL, conduint a la inducció sinèrgica d'apoptosi. Aquests resultats indiquen que l'increment transcripcional de les proteïnes BH3-only juga un paper important en l'activitat antitumoral del vorinostat en el MCL, i que els HDACis sols o en combinació amb els agents que imiten les BH3-only poden representar una aproximació terapèutica prometedora per als pacients de MCL.

El sorafenib inhibeix les cinases del BCR i bloqueja els senyals migratoris i de supervivència derivats del microambient en cèl·lules de CLL

López-Guerra M*, Xargay-Torrent S*, Pérez-Galán P, Saborit-Villarroya I, Rosich L, Villamor N, Aymerich M, Roué G, Campo E, Montserrat E, Colomer D.

*Aquests autors comparteixen primera autoria.

Leukemia. 2012 Jun;26(6):1429-32

Resum

La leucèmia limfàtica crònica és una malaltia caracteritzada per l'acumulació de limfòcits B a la sang, moll de l'os i teixits limfoides secundaris que roman incurable amb la teràpia convencional. El sorafenib és un inhibidor multi-cinasa aprovat per al tractament dels carcinomes hepatocel·lular i renal. El nostre objectiu va ser investigar la capacitat del sorafenib d'interferir amb la senyalització del receptor de cèl·lula B i avaluar la seva eficàcia en la modulació dels senyals migratoris i de supervivència del microambient. El sorafenib va induir apoptosi selectiva en la majoria de casos de CLL, amb preferència pels casos de mal pronòstic de la malaltia, els que tenen els gens de la regió variable de les immunoglobulines no mutats, i per les cèl·lules de CLL derivades de gangli limfàtic. A nivell molecular, sorafenib va inhibir ERK de forma primerenca però no sostinguda, indicant que no és crucial pel mecanisme de sorafenib en la CLL. Entre les cinases modulades pel sorafenib en les cèl·lules de CLL, el bloqueig de les cinases associades al BCR, SRC i SYK, era particularment rellevant per a la seva acció. A més, el sorafenib va ser capaç de superar l'estimulació del BCR, així com també l'efecte protector del cocultiu estromal. El compost resensibilitzava les cèl·lules de CLL cultivades amb l'estroma a l'apoptosi induïda per fludarabina i bendamustina. Per altra banda, el sorafenib va inhibir la migració de les cèl·lules de CLL envers CXCL12 i va bloquejar l'activació de FAK induïda per CXCL12 o pel BCR. Aquests resultats indiquen que el sorafenib podria superar el microambient tumoral i ser particularment efectiu en la inhibició del senyal del BCR en cèl·lules amb elevat potencial migratori, especialment en pacients de CLL d'alt risc.

El sorafenib inhibeix la migració i la resistència a bortezomib deguda a l'estroma mitjançant la interferència amb la senyalització del receptor de cèl·lules B i la traducció proteica en limfoma de cèl·lules del mantell.

Xargay-Torrent S*, López-Guerra M*, Saborit-Villarroya I, Rosich L, Navarro A, Montraveta A, Pérez-Galán P, Roué G, Campo E, Colomer D.

*Aquests autors comparteixen primera autoria.

Clin Cancer Res. 2013 Feb 1;19(3):586-97.

Resum

El limfoma de cèl·lules del mantell és un limfoma B agressiu que sobreexpressa ciclina D1 degut a la translocació t(11;14)(q13;q32). Les teràpies actuals han mostrat una eficàcia limitada, per la qual cosa el nostre objectiu va ser estudiar les propietats antitumorals de l'inhibidor multi-cinasa sorafenib en el MCL. El sorafenib va induir una desfosforilació ràpida de les cinases associades al BCR, SYK i LYN, així com també de FAK, una diana de SRC implicada en l'adhesió focal. En aquesta línia, el sorafenib va mostrar un fort sinergisme amb l'inhibidor de SYK, R406. El sorafenib també bloquejava la traducció de ciclina D1 i MCL1, que promovia un desequilibri entre les proteïnes pro i antiapoptòtiques i facilitava l'alliberament de BAX de la ciclina D1, comportant la inducció de l'apoptosi mitocondrial i dels mecanismes caspasa-dependents i independents. A més, el sorafenib inhibia la migració de les cèl·lules de MCL i la polimerització d'actina induïda per CXCL12. El silenciament de FAK prevenia parcialment aquest efecte inhibitori, indicant que FAK és una diana rellevant del sorafenib. El compost també resensibilitzava les cèl·lules de MCL cultivades amb l'estroma a l'apoptosi induïda per bortezomib. Els resultats demostren per primer cop que el sorafenib interfereix amb la via del BCR, la traducció proteica i modula els senyals de supervivència del microambient en el MCL, suggerint que el sorafenib, sol o en combinació amb bortezomib, podria representar una estratègia terapèutica prometedora per al tractament dels pacients de MCL.

Efecte antitumoral sinèrgic d'acadesina (AICAR) en combinació amb l'anticòs monoclonal anti-CD20 rituximab en models *in vitro* i *in vivo* de limfoma de cèl·lules de mantell

Montraveta A, Xargay-Torrent S, López-Guerra M, Rosich L, Pérez-Galán P, Salaverria I, Beà S, Kalko SG, de Frias M, Campàs C, Roué G, Colomer D.

Oncotarget. 2014 Feb 15;5(3):726-39.

Resum

El limfoma de cèl·lules del mantell és considerat un dels limfomes més desafiadors, amb limitades respostes a les teràpies actuals. L'acadesina, un anàleg de nucleòsids, ha mostrat activitat antitumoral en diferents models preclínics de càncer i en un assaig clínic de fase I/II en leucèmia limfàtica crònica. En aquest treball, hem observat que l'acadesina exerceix activitat antitumoral selectiva en la majoria de les línies de MCL i mostres primàries, de forma independent de factors citogenètics adversos. A més, l'acadesina és sinèrgica, tant *in vivo* com *in vitro*, amb l'anticòs monoclonal anti-CD20 rituximab, habitualment utilitzat en teràpies combinades en el MCL. L'anàlisi d'expressió gènica en tumors suggeria que l'acadesina modula la resposta immunològica, la organització del citoesquelet d'actina i la unió a metalls, per tant contribuint substancialment en els processos metabòlics. El rituximab també va induir canvis en la unió a metalls i en les respostes immunològiques. La combinació dels dos agents va millorar la signatura gènica corresponent a cada un dels compostos, incrementant els gens involucrats en la inflamació, estrès metabòlic, apoptosi i proliferació. Aquests efectes podrien ser importants ja que l'apoptosi aberrant i les vies proinflamatòries juguen un paper significatiu en la patogènesi del MCL. En resum, els nostres resultats suggereixen que l'acadesina exerceix un efecte citotòxic en el MCL en combinació amb rituximab, mitjançant la disminució de les signatures de proliferació i supervivència, el que dona suport a l'examinació clínica d'aquesta estratègia en els pacients de MCL.

