

Regulació de la xarxa PKC/PI3K/Akt: Possible diana terapèutica per la leucèmia limfocítica crònica de cèl·lules B

Mercè de Frias Sánchez

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.tesisenxarxa.net) 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. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (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.tesisenred.net) 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. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (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.tesisenxarxa.net) service 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 neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This 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 de BIOMEDICINA
Bienni 2004-2006**

**Regulació de la xarxa PKC/PI3K/Akt:
Possible diana terapèutica per la
leucèmia limfocítica crònica de cèl·lules B**

**Aquesta tesi ha estat realitzada sota la direcció del Dr. Joan Gil Santano a
la Unitat de Bioquímica del Departament de Ciències Fisiològiques II de la
Universitat de Barcelona**

Mercè de Frias Sánchez

Dr. Joan Gil Santano

Memòria presentada per **Mercè de Frias Sánchez**
per optar al grau de **Doctor per la Universitat de Barcelona**

ÍNDEX

INTRODUCCIÓ.....	1
1. APOPTOSI I CÀNCER.....	3
1.1. EL PROCÈS APOPTÒTIC.....	3
1.2. DESCOBRIMENT DE L' APOPTOSI EN <i>C.ELEGANS</i>	6
1.3. MAQUINÀRIA EXECUTORA DEL PROCÉS APOPTÒTIC: CASPASES I IAPS.....	7
1.4. VIES D' APOPTOSI.....	7
1.4.1. VIA EXTRÍNSECA O DE RECEPTORS DE MORT.....	7
1.4.2. VIA INTRÍNSECA O MITOCONDRIAL.....	9
1.4.2.1. REGULACIÓ DE LA VIA MITOCONDRIAL: LA FAMÍLIA DE BCL-2.....	11
1.4.2.2. INTERACCIONS ENTRE ELS MEMBRES DE LA FAMÍLIA DE BCL-2.....	13
1.4.2.3. LES PROTEÏNES BH3-ONLY COM SENSORS CEL·LULARS.....	15
1.5. L' APOPTOSI EN LA TERÀPIA DEL CÀNCER.....	16
2. SUPERVIVÈNCIA CEL·LULAR.....	17
2.1. PROTEÏNA QUINASA C (PKC).....	19
2.1.1. CLASSIFICACIÓ.....	19
2.1.2. ESTRUCTURA.....	19
2.1.3. MECANISMES DE REGULACIÓ.....	20
2.1.4. FUNCIONS DE LES ISOFORMES DE PKC.....	22
2.2. FOSFATIDILINOSITOL 3-QUINASA (PI3K).....	23
2.2.1. CLASSIFICACIÓ I ESTRUCTURA.....	23
2.2.2. SENYALITZACIÓ.....	27
2.2.3. SUBSTRATS DE PI3K.....	29
2.2.3.1. PDK1.....	29
2.2.3.2. Akt/PKB.....	30
2.2.3.2.1. ESTRUCTURA.....	30
2.2.3.2.2. REGULACIÓ.....	31
2.2.3.2.3. SUBSTRATS.....	32
2.2.3.3. SGK3.....	36
2.2.4. REGULACIÓ NEGATIVA DE LA VIA PI3K/AKT.....	36
2.2.4.1. FOSFATASES DE FOSFATIDILINOSITOLS.....	36
2.2.4.2. PHLPP.....	37
2.2.4.3. MECANISMES DE FEEDBACK.....	38
2.2.5. MUTACIONS I ALTERACIONS DE PI3K/AKT EN CÀNCER.....	38
3. LEUCÈMIA LIMFOCÍTICA CRÒNICA.....	39
3.1. DEFINICIÓ I EPIDEMIOLOGIA.....	39
3.2. SIGNES, SÍMPTOMES I COMPLICACIONS.....	40
3.3. ETIOLOGIA.....	41

3.4. ORIGEN.....	41
3.5. ALTERACIONS GENÈTIQUES.....	42
3.6. DIAGNÒSTIC.....	45
3.7. PRONÒSTIC.....	45
3.8. IMPACTE DEL MICROENTORN CEL·LULAR.....	49
3.9. VIES DE SUPERVIVÈNCIA I RESISTÈNCIA A L' APOPTOSI.....	51
3.9.1. LA VIA DE PKC.....	51
3.9.2. LA VIA DE PI3K/AKT.....	52
3.9.3. LA VIA DE NFκB.....	54
3.9.4. LA VIA DE P53/ATM.....	54
3.9.5. LES VIES APOPTÒTIQUES I LA FAMÍLIA DE BCL-2.....	55
3.10. MODELS MURINS.....	56
3.11. TRACTAMENT.....	57
3.11.1. AGENTS ALQUILANTS I ANÀLEGS DE PURINES.....	58
3.11.2. ANTICOSSOS MONOCLONALS.....	59
3.11.3. ALTRES TRACTAMENTS I COMBINACIONS.....	59
3.11.4. PROBLEMES DE LA TERÀPIA ACTUAL.....	60
3.11.5. NOUS TRACTAMENTS.....	61
3.11.6. LA VIA DE PKC/PI3K/AKT COM A DIANA TERAPÈUTICA.....	62
OBJECTIUS.....	65
RESULTATS.....	69
CAPÍTOL 1. Regulació d'Akt per vies dependents i independents de PI3K en les cèl·lules de LLC: paper de PKCβ.....	71
CAPÍTOL 2.Efecte dels inhibidors d'Akt en les cèl·lules de LLC.....	93
CAPÍTOL 3.Efecte dels inhibidors selectius de PI3K en les cèl·lules de LLC.....	113
CAPÍTOL 4.Efectes dels alquilfosfolípids edelfosina i perifosina en les cèl·lules de LLC.....	123
DISCUSSIÓ.....	133
CONCLUSIONS.....	151
PACIENTS, MATERIALS I MÈTODES	155
ABREVIACIONS.....	177
BIBLIOGRAFIA.....	181
PUBLICACIONS.....	209

INTRODUCCIÓ

1. APOPTOSI I CÀNCER

1.1. EL PROCÈS APOPTÒTIC.

L'apoptosi és un procés fisiològic de mort cel·lular, essencial pel desenvolupament embrionari i l'homeòstasi tissular dels organismes pluricel·lulars (Kerr *et al.*, 1972). A través d'aquest procés s'eliminen de manera controlada les cèl·lules lesionades, velles, ectòpiques, i potencialment perilloses. Aquest via de mort programada està conservada evolutivament i respon tant a estímuls fisiològics com patològics (Danial *et al.*, 2004). En condicions d'homeòstasi en un organisme adult, cada duplicació cel·lular ha de ser compensada per l'eliminació d'una altra cèl·lula. En el cos humà aquest procés es dona milions de vegades per segon, i està àmpliament regulat per senyals tant positives com negatives. Però a vegades es desregula, donant lloc a l'aparició de patologies (Figura 1.1). L'excés d'apoptosi pot donar lloc a malalties neurodegeneratives, immunodeficiències i infertilitat, mentre que la resistència o la disminució de l'apoptosi pot donar lloc a malalties autoimmunes o a l'aparició de càncer (Danial *et al.*, 2004).

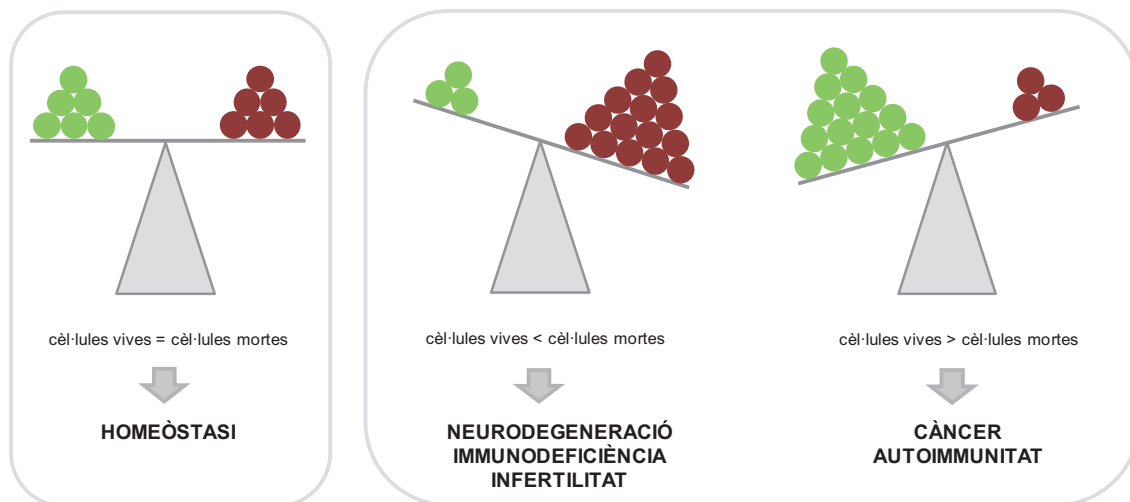


Figura 1.1. L'apoptosi manté l'homeòstasi en els teixits equilibrant la proliferació i la mort de les cèl·lules. La desregulació en l'apoptosi provoca un desequilibri, el que resulta en patologies per pèrdua prematura de cèl·lules o excés de supervivència cel·lular (Modificat de Walensky, 2006).

Si bé l'alteració de l'apoptosi no és l'únic element necessari pel desenvolupament d'un tumor, la resistència a la seva inducció és una característica comú en tots els càncers (Figura 1.2) (Hanahan *et al.*, 2000; Spurgers *et al.*, 2006). A més, la majoria dels quimioterapèutics actuals utilitzen els mecanismes d'inducció d'apoptosi per la seva acció antitumoral (Blagosklonny, 2005).

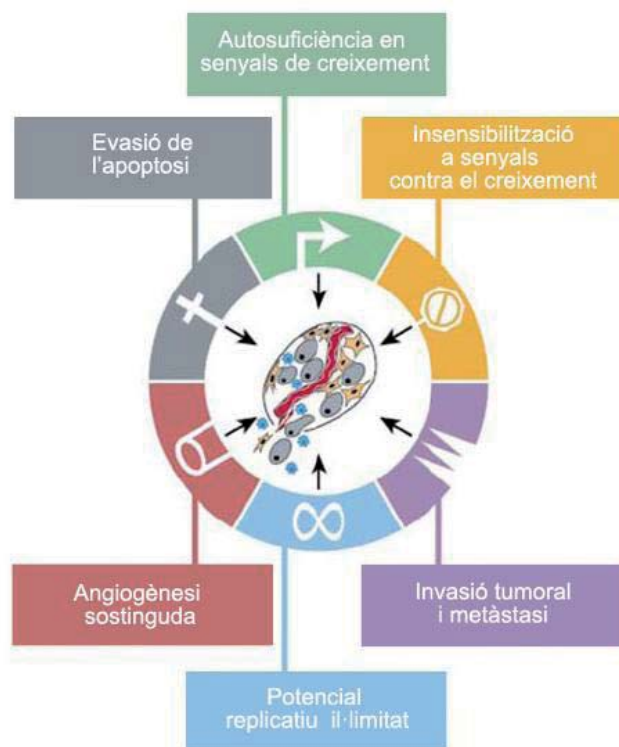


Figura 1.2. Capacitats adquirides en càncer. Hanahan i Weinberg van descriure les sis característiques distintives que s'acumulen durant el procés tumoral. Els mecanismes i l'ordre cronològic d'aparició d'aquestes característiques poden variar segons el tipus o subtipus de càncer. A més, en alguns casos una lesió genètica en particular pot conferir diverses capacitats simultàniament, reduint el nombre de passos necessaris per completar la generació del tumor. L'adquisició de resistència a l'apoptosi és un esdeveniment comú en la tumorigènesi (Modificat de Hanahan *et al.*, 2000).

Durant el procés apoptòtic, la morfologia cel·lular s'altera (Figura 1.3). En el nucli, la cromatina es condensa, els nucleols es desintegren i es redueix la mida del nucli. També es redueix el volum total de la cèl·lula, que es torna més densa. Els òrgans es condensen i el reticle endoplasmàtic es dilata, però els mitocondris es mantenen morfològicament intactes. En les etapes finals del procés, el nucli i el citoplasma es fragmenten i s'encapsulen en vesícules envoltades de membrana, formant els cossos apoptòtics. En el procés d'apoptosi, a diferència de la necrosi, la membrana plasmàtica es manté íntegra durant tot el procés, evitant el vessament del material citoplasmàtic al espai intercel·lular. Així s'assegura un procés de mort cel·lular sense inflamació. L'apoptosi finalitza amb el reconeixement i fagocitosi dels cossos apoptòtics pels macròfags (Rodenburg *et al.*, 2000).

De manera paral·lela a aquests canvis morfològics, la cèl·lula apoptòtica experimenta una sèrie de canvis bioquímics. Es produeix una pèrdua de potencial de membrana mitocondrial i es perd l'asimetria de la membrana plasmàtica. La fosfatidilserina, un fosfolípid que en condicions normals es troba exclusivament a la cara interna de la bicapa lipídica, sofreix l'anomenat "Flip-

flip", quedant exposada també en la cara externa. Aquest és un esdeveniment primerenc (Fadok *et al.*, 1992) i forma part de les senyals que permeten als macròfags reconèixer i fagocitar les cèl·lules apoptòtiques *in vivo* (Fadok *et al.*, 2000; Savill *et al.*, 2000). A més, s'activen endonucleases que tallen l'ADN genòmic pels espais nucleosomals generant fragments d'ADN múltiples de 180 parells de bases (Wyllie *et al.*, 1980; Nagata, 2000; Danial *et al.*, 2004). Aquests canvis bioquímics s'utilitzen com marcadors de les diferents etapes de l'apoptosi.

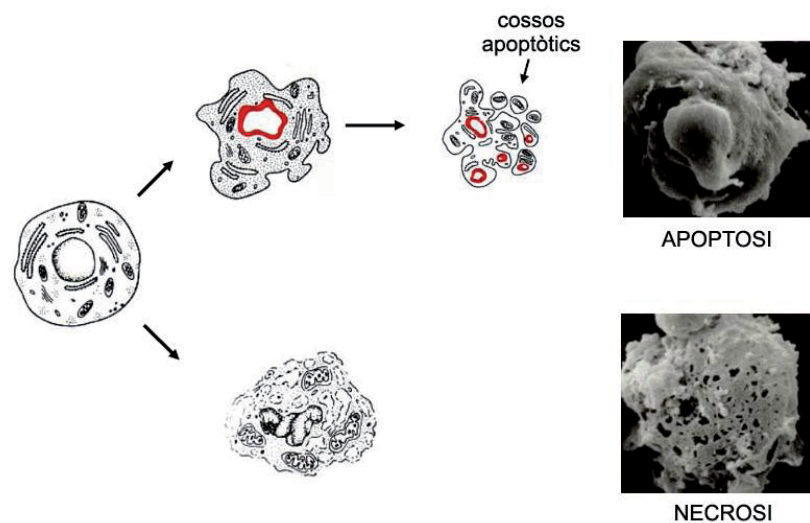


Figura I.3. Diferències morfològiques entre cèl·lules apoptòtiques i necròtiques. L'apoptosi és un procés de mort cel·lular regulat per evitar que el contingut intracel·lular es vessi a l'exterior, evitant la inflamació. En les imatges de microscopia electrònica s'observa (a dalt) la integritat de la membrana citoplasmàtica i l'aparició de cossos apoptòtics en el procés d'apoptosi, i a baix l'aparició de lesions i el trencament de la membrana citoplasmàtica durant la necrosi (Modificat de www.cyto.purdue.edu).

L'apoptosi es troba bloquejada en les cèl·lules viables. Quan reben senyals inductores d'apoptosi, tant fisiològiques (falta de factors de creixement o atacs immunològics per interacció lligand-receptor) com externes (drogues quimioterapèutiques, estrès osmòtic, químic o tèrmic, i radiacions ionitzants o no ionitzants), les cèl·lules inicien la maquinària d'apoptosi.

En el procés apoptòtic poden distingir-se tres fases:

1. Fase iniciadora. Els factors inductors d'apoptosi entren en contacte amb la cèl·lula i desencadenen una sèrie de respostes intracel·lulars, diferents per cada estímul, que transmeten el senyal a la maquinària d'apoptosi. S'han definit tres mecanismes d'iniciació d'apoptosi: (a) per receptors de mort, (b) per dany cel·lular (com estrés o irradiació) i (c) per acció de les cèl·lules T citotòxiques.

2. Fase executora. Un cop integrada la resposta als estímuls, la cèl·lula pren la decisió de morir. En aquest punt, a partir del que el procés és irreversible, s'activen en forma de cascada les proteïnes efectores de l'apoptosi, les caspases, que són proteases encarregades de la destrucció cel·lular. Aquest és el punt de convergència de gairebé totes els senyals inductors d'apoptosi.

3. Fase de destrucció. L'activació de la maquinària efectora de mort fa que la cèl·lula perdi la seva integritat i presenti els canvis bioquímics i morfològics típics de l'apoptosi.

1.2. DESCOBRIMENT DE L'APOPTOSI EN *C.ELEGANS*.

Inicialment, els estudis en apoptosi es van realitzar en el nematode *Caenorhabditis elegans* (Brenner, 1974), on es va descriure com 131 de les seves 1090 cèl·lules morien de manera programada durant el seu desenvolupament (Sulston, 1976). Posteriorment, es van descobrir les proteïnes CED-3 i CED-4 (*cell death abnormality*), responsables del procés apoptòtic, CED-9 que les antagonitza (Shaham *et al.*, 1996), i EGL-1, que actua dissociant CED-9 de CED-4, possibilitant l'activació de CED-3, i per tant, la inducció d'apoptosi.

Els estudis realitzats en aquest model han permès definir les característiques de l'apoptosi i demostrar que aquest procés depèn de la interacció directa entre proteïnes reguladores i proteïnes efectores. El primer homòleg de les proteïnes CED trobat en animals vertebrats va ser BCL-2 (*B cell leukemia/lymphoma-2*) (Hengartner *et al.*, 1994), una proteïna que havia estat descrita prèviament (Tsujimoto *et al.*, 1984), que és estructuralment i funcionalment similar a CED-9, i per tant, un regulador negatiu del procés apoptòtic. Actualment, cadascun dels gens *ced* i *egl* de *C.elegans* tenen com a mínim un homòleg funcional en mamífers. L'homòleg de CED-3 són les caspases, n'hi ha 14 membres; el de CED-4 és APAF-1; el de CED-9 són els membres de la família de BCL-2; i el d'EGL-1 són els membres BH3-*only* de la família de BCL-2.

1.3. MAQUINÀRIA EXECUTORA DEL PROCÉS APOPTÒTIC: CASPASES I IAPS.

La maquinària executora de l'apoptosi està constituïda per una família de proteases d'aspartat i cisteïna. Aquests enzims proteolitzen proteïnes vitals per la cèl·lula, així com proteïnes que contribuiran a la destrucció cel·lular produint els canvis morfològics i bioquímics característics de l'apoptosi (Thornberry *et al.*, 1998; Danial *et al.*, 2004). S'estima que les caspases tenen més de 400 substrats, que inclouen proteïnes del citoesquelet, quinases, enzims de reparació de l'ADN i proteïnes involucrades en el tall de l'ARNm (Meier *et al.*, 2007).

Les caspases són sintetitzades en forma de zimògens o proenzims i s'activen en resposta a senyals apoptòtics. Es poden classificar en tres grups, segons la seva funcionalitat (Fuentes-Prior *et al.*, 2004). Així, trobem les caspases iniciadores (caspases 2, 8, 9 i 10), que són les primeres en activar-se al rebre l'estímul apoptòtic i s'activen per dimerització de les formes zimògenes mitjançant l'ajut de proteïnes adaptadores; i les caspases executores (caspases 3, 6 i 7), que per ser actives han de ser clivellades per una de les caspases iniciadores. Finalment hi ha les caspases inflammatòries, no relacionades amb apoptosi.

Degut a la irreversibilitat de la mort un cop s'han activat les caspases, la seva activitat està subjecta a una complexa regulació. Les proteïnes inhibidores fisiològiques de les caspases són les IAPs (*inhibitor of apoptosis proteins*). Els principals membres d'aquesta família són XIAP, hIAP1, hIAP2 i Survivina. Actualment, es considera que només XIAP és realment un inhibidor específic de les caspases 3, 7 i 9 (Eckelman *et al.*, 2006), mentre que hIAP1 i hIAP2 s'uneixen a Smac/DIABLO (Du *et al.*, 2000; Verhagen *et al.*, 2000) i Omi/HtrA2 (Suzuki *et al.*, 2001) dues proteïnes que s'alliberen del mitocondri. Així, la funció de hIAP1 i hIAP2 és unir-se a aquestes molècules per evitar que aquestes s'uneixin a XIAP i activin les caspases (Eckelman *et al.*, 2006).

1.4. VIES D'APOPTOSI.

En mamífers s'han descrit diferents vies de senyalització que porten a l'activació de caspases iniciadores diferents, però que convergeixen en les caspases efectores i que actuen a diferents nivells per al final induir apoptosi. Les principals vies d'activació de les caspases són analitzades a continuació.

1.4.1. VIA EXTRÍNSECA O DE RECEPTORS DE MORT.

La via apoptòtica de receptors de mort s'inicia per unió de lligands extracel·lulars a receptors de la superfície cel·lular (Danial *et al.*, 2004). Es tracta de lligands de la superfamília del Factor de Necrosi Tumoral (TNF) com $TNF\alpha$, FasL/CD95L, TWEAK i TRAIL, que s'uneixen a receptors de mort (TNFR, Fas/CD95, DR3/Apo2 i DR4/5, respectivament) induint canvis conformacionals que inicien la cascada de senyalització. A través dels anomenats dominis de mort (DD, *death domain*), aquests receptors recluten una sèrie de proteïnes adaptadores no enzimàtiques com

TRADD i FADD. Aquestes proteïnes adaptadores recluten la procaspasa 8 (en humans també pot tractar-se de la procaspasa 10), per unió a dominis efectors de mort (DED), i es forma un complex anomenat DISC (*death-inducing signaling complex*). L'alta concentració de procaspasa 8 al DISC estimula l'activació per autoproteòlisi per proximitat, i així, la caspasa 8 actua sobre altres caspases i desencadena la senyal apoptòtica (Fuentes-Prior *et al.*, 2004) (Figura I.4).

La via extrínseca està regulada a diferents nivells de manera que les cèl·lules puguin respondre de manera més o menys contundent a la unió de lligands als receptors de mort. Així, l'expressió de lligands i el seu transport a la membrana són processos altament regulats. A més de la regulació per part de les proteïnes XIAP, aquesta via de senyalització apoptòtica pot ser inhibida per la família de FLIP (*FLICE-inhibitory proteins*) (Irmeler *et al.*, 1997; Deveraux *et al.*, 1998), que actua desplaçant a la procaspasa 8 del DISC. c-FLIP_L pot ser proteolitzat per l'activitat residual de la procaspasa 8, però al no tenir activitat caspasa no s'activa la cascada proteolítica. A més, la caspasa 8 proteolitza a Bid, i la forma proteolitzada tBid és capaç d'induir la sortida de factors mitocondrials proapoptòtics. Amb això es permet la sortida del citocrom c del mitocondri, i també de Smac/DIABLO i d'Omi/HtrA2, que inhibeixen a XIAP permetent l'activació completa de la via. Així, la proteòlisi de Bid a tBid enllaça aquesta via extrínseca amb la via intrínseca o mitocondrial.

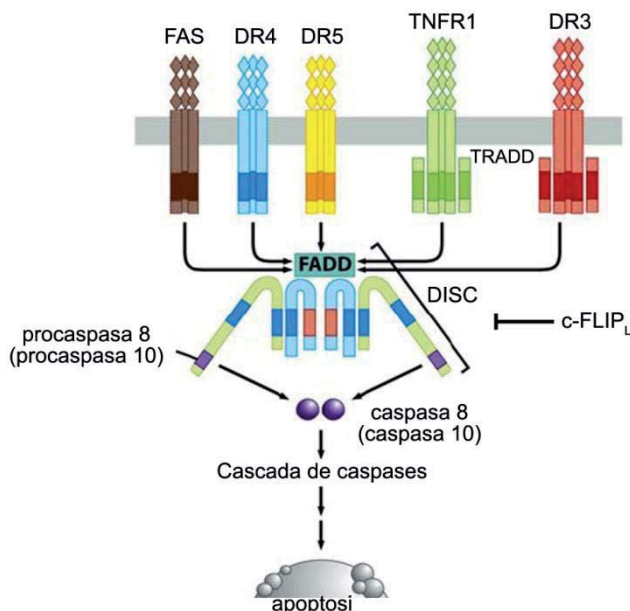


Figura I.4. Via extrínseca d'apoptosi. Esquema de la composició del DISC i de l'activació per proximitat de caspasa-8. c-FLIP_L actua com inhibidor al desplaçar a caspasa 8 (modificat de Weinberg, 2007).

1.4.2. VIA INTRÍNSECA O MITOCONDRIAL.

La via intrínseca, en la que el mitocondri juga un paper essencial, està regulada per proteïnes de la família de BCL-2, i es desencadena en resposta a una gran varietat d'estímuls interns o externs, generalment independents de lligand, com radiacions, agents quimioterapèutics, oxidants, activació d'oncògens, virus i bacteries, falta d'unió a la matriu extracel·lular, o privació de citoquines, neutrofines o factors de creixement (Danial *et al.*, 2004). De manera general, la via mitocondrial d'apoptosi s'activa en resposta a l'estrès cel·lular. Aquests estímuls proapoptòtics modifiquen diversos components cel·lulars que actuen com sensors i que transmeten la senyal de mort al mitocondri. Un cop la senyal arriba al mitocondri s'inicia la permeabilització de la membrana mitocondrial externa o MOMP (*mitochondrial outer membrane permeabilization*), provocant la sortida de diferents proteïnes de l'espai intramembrana mitocondrial al citosol, com citocrom *c*, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2, endonucleasa G, AIF (*apoptosis-inducing factor*) i les caspases 2, 3 i 9 (Van Loo *et al.*, 2002). El citocrom *c* (Liu *et al.*, 1996; Danial *et al.*, 2004) és un component fonamental de la fosforilació oxidativa i de la formació d'ATP al mitocondri. En el citosol, el citocrom *c* s'uneix als dominis autoinhibitoris de la proteïna APAF-1, activant-la. En conseqüència, de manera dependent d'ATP o dATP, APAF-1 oligomeritza junt a la procaspasa 9 formant un complex heptamèric anomenat apoptosoma (Pop *et al.*, 2006). L'apoptosoma està format per varies molècules de citocrom *c*, APAF-1 i procaspasa 9, i indueix la reorganització del centre actiu i l'activació de la caspasa 9 que activa les caspases efectores (Acehan *et al.*, 2002) (Figura 1.5). Les cèl·lules deficientes en citocrom *c*, APAF-1 (Yoshida *et al.*, 1998) o caspasa 9 (Kuida *et al.*, 1998) presenten defectes en l'apoptosi en resposta a senyals internes, demostrant la importància d'aquests elements en aquesta via.

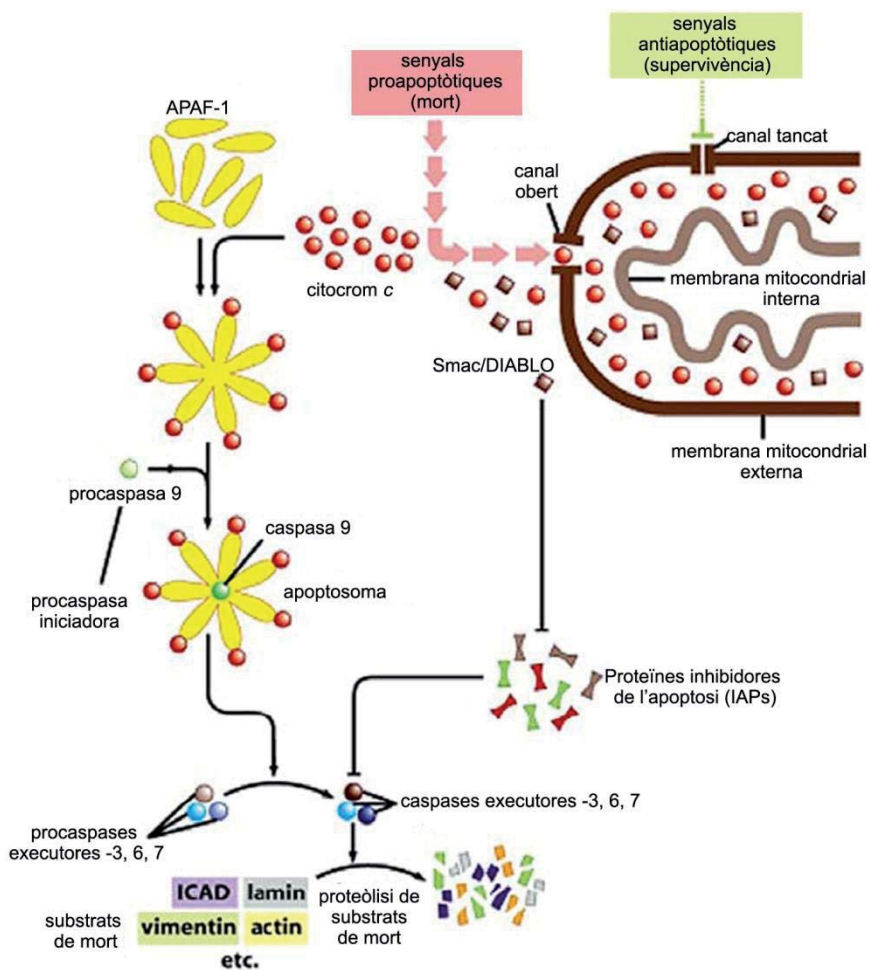


Figura I.5. Via intrínseca d'apoptosi. La permeabilització de la membrana mitocondrial externa permet la sortida de citocrom *c*, que va a formar l'apoptosoma amb APAF-1, el que permet l'activació successiva de les caspases iniciadores i efectores (adaptat de Weinberg, 2007).

1.4.2.1. REGULACIÓ DE LA VIA MITOCONDRIAL: LA FAMÍLIA DE BCL-2.

El mitocondri és un orgànu intracel·lular vital, i entre les seves funcions s'inclouen la producció d'ATP, la regulació de l'apoptosi i la regulació i biosíntesi de diversos metabòlits. Les proteïnes de la família de BCL-2 regulen la formació del MOMP, a través del que diverses proteïnes del espai intramembranal, entre elles el citocrom *c*, surten del mitocondri per activar la maquinària apoptòtica del citosol, les caspases.

Les proteïnes de la família de BCL-2 constitueixen el principal punt de control de la via intrínseca d'apoptosi (Walensky, 2006; Youle *et al.*, 2008). El membre fundador de la família va ser l'oncogen *BCL-2*, que es va identificar en la translocació t(14; 18) del limfoma fol·licular humà (Tsujiimoto *et al.*, 1984; Bakhshi *et al.*, 1985; Cleary *et al.*, 1985; Tsujiimoto *et al.*, 1985). A diferència d'altres oncògens identificats, es va identificar que BCL-2 era capaç de promoure la supervivència cel·lular més que d'induir-ne la proliferació (Vaux *et al.*, 1988). Actualment sabem que la família de BCL-2 està formada per membres pro- i antiapoptòtics que comparteixen uns dominis d'homologia anomenats BH (*BCL-2 homology*). Aquests dominis permeten la interacció entre els diferents membres per poder activar o inhibir l'apoptosi. Els membres proapoptòtics poden subdividir-se segons la seva estructura i funció (Figura 1.6), i es classifiquen en tres grups:

- **Membres antiapoptòtics (BCL-2-like)**

BCL-2 és el membre més representatiu d'aquest grup. Junt amb altres membres similars estructuralment com BCL-X_L, BCL-W i BOO/DIVA/BCL-B, i membres més divergents com MCL-1 i A1/BFL-1, protegeixen les cèl·lules d'un ampli ventall d'agressions citotòxiques, com són la privació de citoquines, la radiació UV o γ , ROS (espècies reactives d'oxigen) o agents quimioterapèutics (Danial *et al.*, 2004). Tots ells contenen 3 o 4 dominis BH, excepte MCL-1, que en té només 2. Els dominis BH1, BH2 i BH3 formen una butxaca hidrofòbica que permet la interacció amb el domini BH3 dels membres proapoptòtics.

- **Membres proapoptòtics multidomini (BAX-like)**

Dins aquest grup trobem BAX, BAK, BOK/MTD, BCL-G_L i BCL-X_S (variant de *splicing* del gen *BCL-X*), que són molt similars en seqüència i estructuralment a BCL-2, i conserven 2 o 3 dominis BH (BH1, 2 i 3). Quan s'activen actuen perturbant les membranes intracel·lulars, formant, suposadament, porus en la membrana mitocondrial externa, que induïrien el MOMP que permetria la sortida dels factors mitocondrials (Danial *et al.*, 2004).

- **Membres proapoptòtics amb només el domini BH3 (BH3-only)**

Aquest grup de membres proapoptòtics té una seqüència més divergent als altres membres de la família de BCL-2, ja que només mantenen el domini BH3, que sembla indispensable per la seva funció proapoptòtica. Dins d'aquest grup s'inclouen BAD, BCL-G_S (variant de *splicing* del gen *BCL-G*), BID, BIM/BOD, BIK/NBK/BLK, BNIP3/NIX, NIP3, BMF, HRK/DP5, NOXA, PUMA i MCL-1_S (variant de *splicing* del gen *MCL-1*).

A més, s'han descrit varies formes de *splicing* alternatiu de moltes proteïnes de la família. Per exemple, proteïnes antiapoptòtiques que el seu *splicing* tindria una funció proapoptòtica, com el cas de MCL-1_S, variant de MCL-1_L. O al contrari, Bid_S, *splicing* alternatiu de Bid_{EL} o Bid_L, té un paper antiapoptòtic, ja que no disposa de domini BH3, i és proteolitzat per caspasa 8. Així, podria actuar com competidor de l'activació de Bid_{EL} i Bid_L. De la proteïna BIM s'han descrit 19 variants de *splicing* (Akgul *et al.*, 2004).

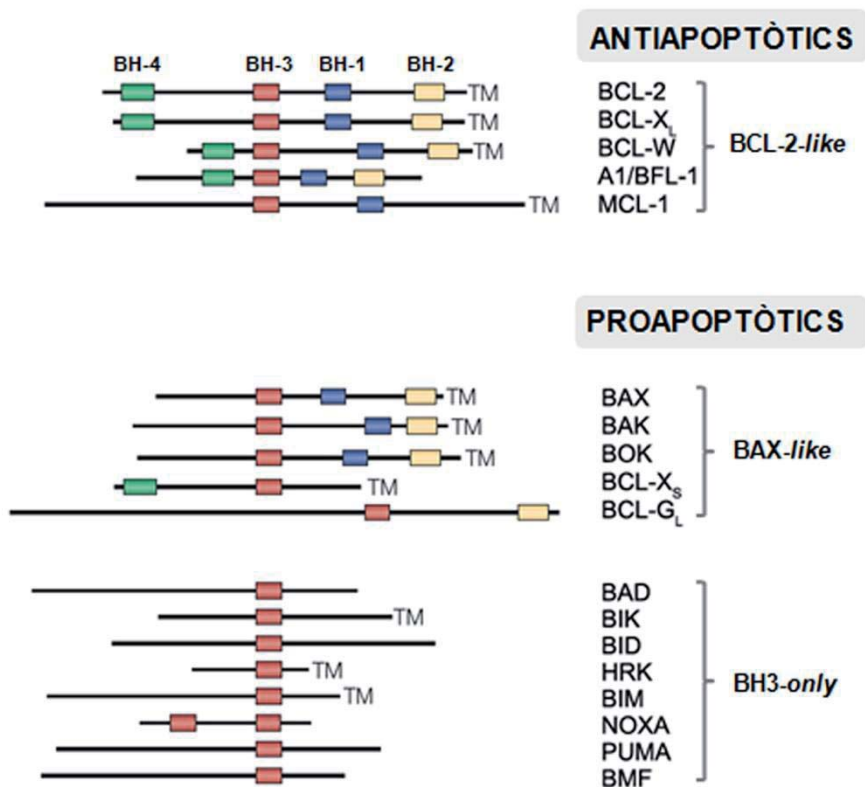


Figura 1.6. Representació dels membres de la família de BCL-2. Es mostren les 3 famílies: en general, els membres de *BCL-2-like* promouen la supervivència cel·lular, mentre que els membres *BAX-like* i els *BH3-only* promouen l'apoptosi. Es mostren els dominis BH i el TM, que correspon al domini lipídic transmembrana (modificat de Strasser, 2005).

La majoria de membres antiapoptòtics (*BCL-2-like*) i proapoptòtics (*BAX-like*) i alguns dels *BH3-only* tenen un domini transmembrana (TM), important pel seu direccionament cap a les diferents membranes cel·lulars. Estudis de localització en cèl·lules col·loquen a BCL-2 a les membranes del mitocondri, de l'embolcall nuclear i del reticle endoplasmàtic; a BCL-X_L i MCL-1 en el citosol (Hsu *et al.*, 1997; Nijhawan *et al.*, 2003) i a BCL-W principalment en el mitocondri (Krajewski *et al.*, 1993). Els membres *BAX-like* proapoptòtics també difereixen en la seva localització: BAK es troba associat a les membranes del mitocondri i del reticle endoplasmàtic, mentre que BAX es troba al citosol i transloca a membrana mitocondrial quan s'activa (Hsu *et al.*, 1997). Els membres *BH3-only*, degut a la seva capacitat d'interacció amb altres membres, es poden trobar localitzats allà on interaccionin.

1.4.2.2. INTERACCIONS ENTRE ELS MEMBRES DE LA FAMÍLIA DE BCL-2.

Les proteïnes de la família de BCL-2 s'associen entre si a través dels seus dominis BH per formar homo- i/o hetero-complexes que juguen diferents papers en el procés de permeabilització de la membrana mitocondrial externa (MOMP) i la sortida del citocrom *c*. S'ha descrit que BAX i BAK són essencials per la formació del MOMP i l'apoptosi, tot i que es desconeix com BAX i BAK porten a terme la permeabilització de la membrana mitocondrial externa (Antignani *et al.*, 2006). Les proteïnes *BH3-only* tenen una funció anterior a la de BAX/BAK, ja que la seva expressió en el doble *knock-out* (*DKO*) no restaura la resistència a la sortida de citocrom *c*, i la sobreexpressió de BCL-2 o BCL-X_L bloqueja el MOMP induït per l'expressió de les proteïnes *BH3-only*. Així, els membres de la família de BCL-2 són crucials per determinar la resposta mitocondrial a diversos estímuls apoptòtics (Chipuk *et al.*, 2006; Garrido *et al.*, 2006).

Existeixen diferents models per explicar el funcionament dels membres de la família de BCL-2, com interaccionen entre si i quina és la seva funció en la regulació de l'apoptosi. Els membres *BH3-only* funcionen com sensors cel·lulars que inicien la cascada que desencadenarà l'apoptosi, integrant les diferents senyals de supervivència o de dany intracel·lular. Existeixen dos models per l'activació de BAX i BAK: el model d'activació directa i el model d'activació indirecta, tots dos resumits a la figura 1.7.

En el **model d'activació indirecta**, totes les proteïnes BH3-*only* inactiven les antiapoptòtiques BCL-2-*like*, tot i que l'especificitat de les interaccions varia. Algunes BH3-*only*, com BID, BIM i PUMA poden inhibir totes les proteïnes antiapoptòtiques BCL-2-*like*, i són les més potents, mentre que NOXA, BMF i BAD només s'uneixen a algunes proteïnes BCL-2-*like*. En aquest model, la unió de les proteïnes BH3-*only* allibera i activa BAX i BAK per tal que pugui induir la permeabilització de la membrana mitocondrial. En el **model d'activació directa**, les proteïnes BH3-*only* es divideixen en dos grups: les proteïnes BH3-*only* "activadores", BID, BIM i PUMA activen directament BAX i BAK, i s'inactiven a través de la interacció amb les proteïnes antiapoptòtiques BCL-2-*like*. Les proteïnes BH3-*only* "sensibilitzadores" funcionen desplaçant les "activadores" d'aquestes unions, alliberant BAX i BAK (Meier *et al.*, 2007). Estudis recents demostren que les unions entre els membres antiapoptòtics i els BH3-*only* és específica, amb afinitats d'unió que entre els membres que poden variar fins a 10.000 vegades (Adams *et al.*, 2007) (Figura 1.7).

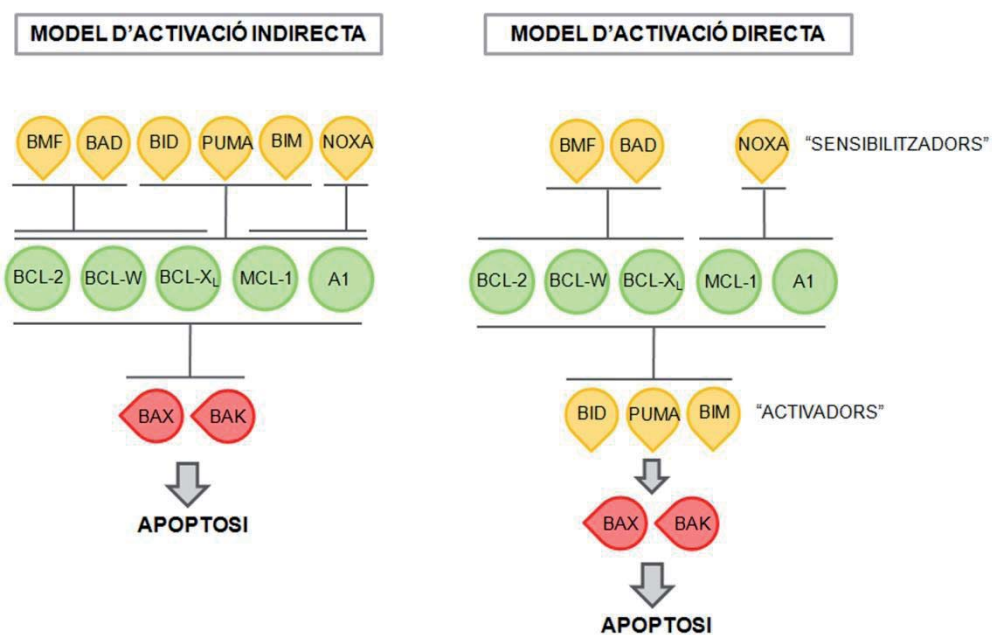


Figura 1.7. Dos models per l'activitat de les proteïnes BH3-*only* en l'apoptosi. A l'esquerra, el model d'activació indirecta i a la dreta, el model d'activació directa (Modificat de Meier *et al.*, 2007).

1.4.2.3. LES PROTEÏNES BH3-ONLY COM SENSORS CEL·LULARS.

El gran nombre de proteïnes BH3-*only* pot donar un control més gran i específic del inici del procés de mort cel·lular, en funció de l'estímul desencadenat (Strasser, 2005). Algunes BH3-*only* només s'expressen en certs tipus cel·lulars i altres semblen controlar un compartiment subcel·lular específic. Cada un dels membres BH3-*only* respon a un tipus d'agressió concreta (Figura I.8), i els seus nivells es poden regular a nivell transcripcional o post-transcripcional. Per exemple, els gens *NOXA* i *PUMA* són induïts pel gen supressor de tumors TP53 en resposta a dany a l'ADN, i són dos gens clau per la inducció d'apoptosi per agents genotòxics, i la transcripció de *BIM* s'indueix per FoxO3a en cèl·lules B després de la deprivació de citoquines *in vitro*. Mentre que *BAD* s'activa per defosforilació en resposta a deprivació de factors de creixement, *BID* té un paper important en la mort induïda a través del receptor de mort activant-se per proteòlisi mitjançada per la caspasa-8 (Strasser, 2005; Youle *et al.*, 2008).

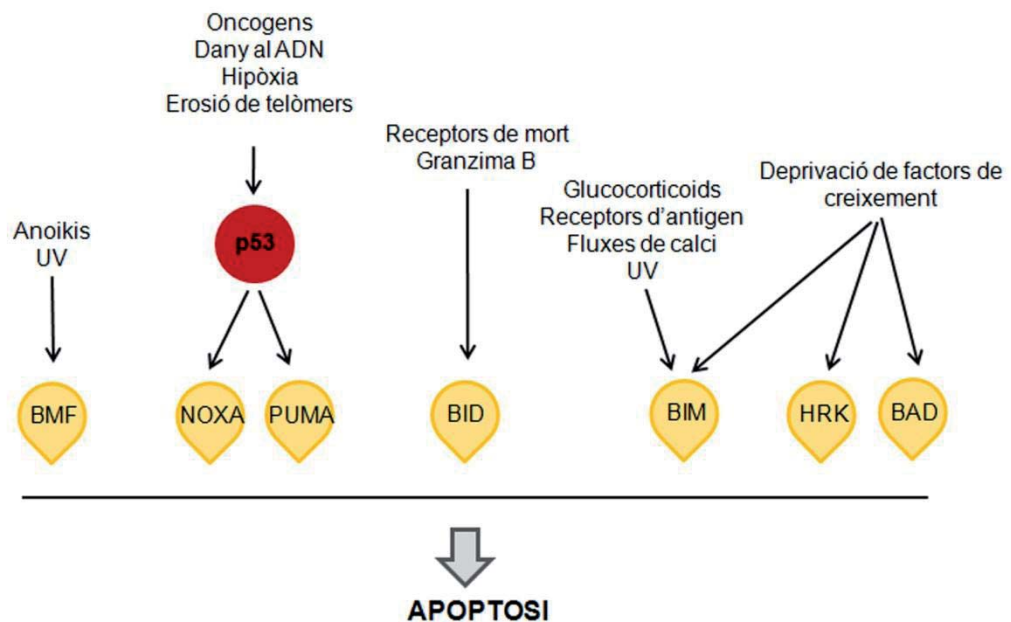


Figura I.8. Cada un dels membres BH3-*only* respon front a un tipus d'agressió molt concreta, tot i que existeix solapament de funcions entre els diferents membres (adaptat de Weinberg, 2007).

1.5. L' APOPTOSI EN LA TERÀPIA DEL CÀNCER.

La desregulació de la mort cel·lular, per activació de vies de supervivència i/o inactivació de vies de senyalització de mort, és crítica per l'aparició del fenotip tumoral. En general, les teràpies que restauren la sensibilitat a la mort cel·lular intervenen selectivament en les vies de les que depèn la supervivència del tumor. Així, els tractaments no quirúrgics del càncer, fonamentalment quimioteràpia i radioteràpia, actuen induint parada de cicle i/o apoptosi en les cèl·lules tumorals (Reed, 2003; Adams *et al.*, 2007). Les radiacions, els fàrmacs que actuen sobre el citoesquelet, els agents genotòxics que danyen el ADN, i molts altres utilitzen (apart dels efectes sobre cicle cel·lular i proliferació) els mecanismes d'inducció d'apoptosi per realitzar la seva activitat antitumoral. Molts dels agents quimioterapèutics indueixen la regulació dels membres de la família de BCL-2 i en concret dels membres BH3-*only* per induir apoptosi. A més, la inducció de l'apoptosi en el tumor correlaciona amb el grau de resposta a la teràpia (Kim *et al.*, 2002). Això implica que les alteracions en la maquinària reguladora i efectora de l'apoptosi poden provocar resistència front la quimioteràpia i radioteràpia, i aquestes alteracions en l'expressió i/o funció de proteïnes antiapoptòtiques i proapoptòtiques són freqüents en càncer. El coneixement d'aquestes alteracions és de gran importància pel desenvolupament de nous agents terapèutics.

En els últims anys, la intervenció terapèutica d'aquesta via ha generat gran interès, i actualment hi ha compostos que actuen sobre les vies d'apoptosi en desenvolupament pre-clínic i clínic. (Labi *et al.*, 2006; Adams *et al.*, 2007; Iglesias-Serret *et al.*, 2007). Per exemple, el compost ABT-263, que actua inhibint els membres antiapoptòtics de la família de BCL-2, o els alquilfosfolípids edelfosina i perifosina, que actuen a nivell dels receptors de mort (estudiats en el capítol 4 de resultats d'aquest memòria).

Així doncs, el coneixement de les alteracions de les vies d'inducció d'apoptosi permetrà el desenvolupament i l'ús de nous fàrmacs de manera racional pel tractament del càncer.

2. SUPERVIVÈNCIA CEL·LULAR

Les cèl·lules reben senyals del seu entorn. Aquests senyals són processats i integrats per circuits de senyalització molt complexos dins de la cèl·lula, que pren una decisió, diferent segons quin hagi estat l'estímul rebut. Aquesta decisió ha de ser presa pel benefici del teixit sencer i inclús de l'organisme, i no pel benefici d'una cèl·lula individual (Weinberg, 2007).

La majoria de senyals no poden travessar la bicapa lipídica de la cèl·lula. No obstant, aconsegueixen generar una resposta cel·lular mitjançant vies de transducció de senyals, que permeten connectar la senyalització de l'exterior de la cèl·lula amb l'interior. En la aquesta transducció de senyals participen un gran nombre de proteïnes de manera seqüencial, començant pels receptors de membrana i les proteïnes acobladores i finalitzant amb els factors de transcripció, que dins el nucli iniciaran o aturaran la transcripció dels gens (Figura 1.9).

Els mecanismes apoptòtics que hem revisat en el primer capítol d'aquesta memòria es troben presents en tots els tipus cel·lulars, però no es troben constantment actius degut a la presència de mecanismes de supervivència que eviten l'entrada descontrolada en apoptosi. Així, els mecanismes de supervivència estan estretament relacionats amb els mecanismes de regulació de les vies apoptòtiques.

S'han descrit múltiples xarxes de transducció de senyals involucrades en la supervivència cel·lular. Dues de les més importants són les rutes dependents de la proteïna quinasa C (PKC) i de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), que revisarem a continuació.

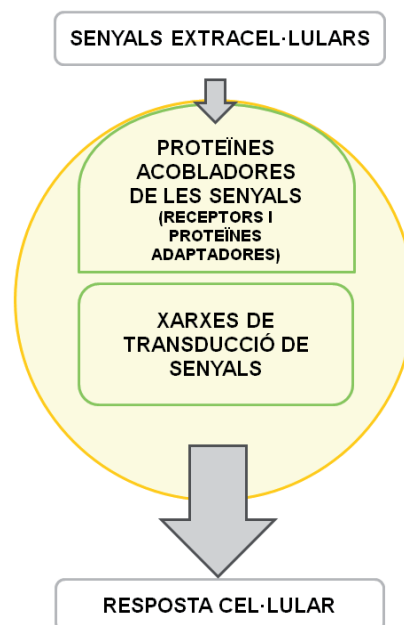


Figura 1.9. Esquema de la transducció de senyals.

2.1. PROTEÏNA QUINASA C (PKC).

La Proteïna quinasa C (PKC) va ser clonada als anys 80 com un receptor fisiològic dels èsters de forbol, productes naturals amb activitat promotora de tumors (Castagna *et al.*, 1982). Les PKC són una família de serina/treonina quinases que regulen diversos processos cel·lulars com proliferació, apoptosi, supervivència cel·lular, diferenciació i migració (Griner *et al.*, 2007).

2.1.1. CLASSIFICACIÓ.

S'han identificat 9 gens de PKC que codifiquen per 11 isoenzims que es classifiquen en tres grups, segons la seva estructura i els cofactors necessaris per la seva òptima activació (Mackay *et al.*, 2007). Així, trobem:

- PKC clàssiques o convencionals (cPKC): PKC α , PKC β I, PKC β II i PKC γ .

Són dependents de calci i s'activen per fosfatidilserina (FS) i diacilglicerol (DAG).

- PKC noves (nPKC): PKC δ , PKC ϵ , PKC η , PKC θ i PKC μ .

Són independents de calci i s'activen per fosfatidilserina (FS) i diacilglicerol (DAG).

- PKC atípiques (aPKC): PKC λ i PKC ζ .

Són independents de calci i no requereixen DAG per la seva activació, tot i que la fosfatidilserina (FS) pot regular la seva activitat.

Les PKC α , δ i ϵ són ubiques, mentre que l'expressió de la resta d'isoformes és específica del tipus cel·lular (Griner *et al.*, 2007). Els èsters de forbol, potents promotors de tumors, poden substituir el DAG en l'activació de les PKC. A diferència del DAG, els èsters de forbol no es metabolitzen i el tractament de les cèl·lules amb aquestes molècules resulta en una activació prolongada de les PKC. Per això, els èsters de forbol (com per exemple el PMA, *phorbol 12-myristate 13-acetate*) s'utilitzen per activar i estudiar les PKC *in vitro* (Newton, 1995).

2.1.2. ESTRUCTURA.

Els isoenzims de la família de les PKC tenen 4 dominis conservats, anomenats C1, C2, C3 i C4. Tots els enzims contenen un domini quinasa conservat en la zona C-terminal i una zona reguladora a l'extrem N-terminal, on es troben els dominis d'interacció amb la membrana cel·lular i una seqüència autoinhibidora específica per cada isoenzim (anomenada pseudosubstrat) (Figura 1.10). Tots aquests factors contribueixen a que les PKC estiguin altament regulades per canvis conformacionals (Newton, 2003; Mackay *et al.*, 2007).

El C1 conté motius rics en cisteïnes, que formen el lloc d'unió pel DAG i pels èsters de forbol. Les PKC clàssiques i noves contenen 2 d'aquests motius, anomenats C1A i C1B, mentre que les PKC atípiques només en contenen un, i no s'ha detectat cap motiu d'unió a èsters de forbol.

El C2 conté el lloc de reconeixement de lípids, i en les PKC clàssiques, el lloc d'unió a calci. El C2 de les PKC noves no conté aquest domini d'unió a calci.

El C3 i el C4 formen el domini d'unió a ATP i el domini d'interacció amb el substrat. Al C4 es troba el bucle d'activació, el motiu de gir i el motiu hidrofòbic. En aquestes tres regions es donen lloc les fosforilacions necessàries per l'activació completa dels enzims de la família de les PKC.

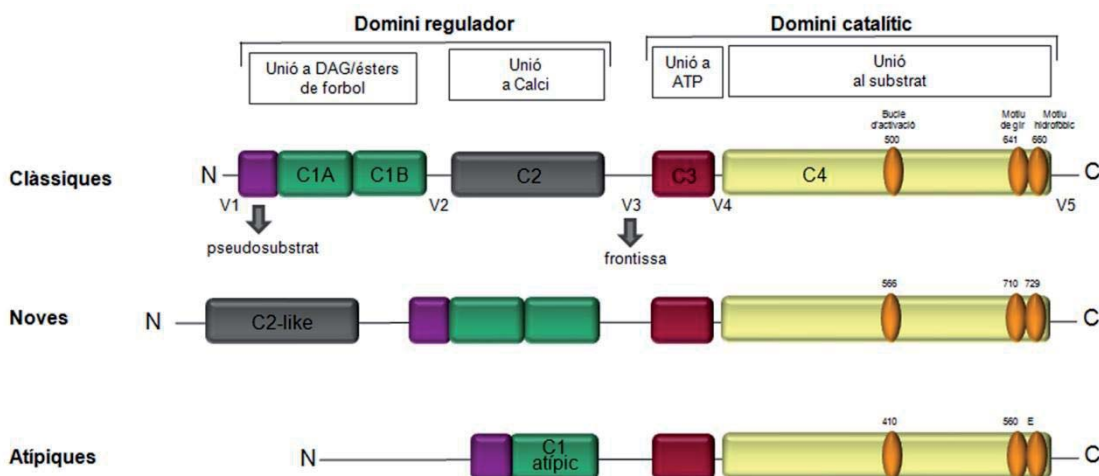


Figura 1.10. Esquema representatiu de l'estructura dels isoenzims de PKC. Adaptat de Mackay *et al.*, 2007.

2.1.3. MECANISMES DE REGULACIÓ.

Els isoenzims de la família de PKC es troben en una conformació inactiva, i abans de ser completament actius sofreixen una sèrie de transfosforilacions i autofosforilacions, que es requereixen per la seva activació completa (Griner *et al.*, 2007; Newton, 2009) (Figura 1.11).

1. Maduració: transfosforilació i autofosforilació.

Les PKC clàssiques sintetitzades *de novo* es troben associades a la membrana citoplasmàtica, en una conformació oberta, on el pseudosubstrat es troba expulsat de la cavitat d'unió al substrat del domini quinasa. La maduració de les PKC compren una sèrie de fosforilacions. La primera té lloc en el bucle d'activació i és mitjançada per PDK1 (*PI3K-Dependent Kinase 1*), que es troba acoblada al extrem C-terminal (Le Good *et al.*, 1998; Sonnenburg *et al.*, 2001). A continuació, es dona la fosforilació al motiu de gir, de manera dependent de mTORC2

(*mamalian target of rapamycin complex 2*) (Facchinetti *et al.*, 2008; Ikenoue *et al.*, 2008). Això afavoreix l'autofosforilació al motiu hidrofòbic, que estabilitza l'enzim, i és alliberat al citosol en una conformació tancada i inactiva, on el pseudosubstrat ocupa la cavitat d'unió al substrat del domini quinasa. L'enzim PKC madur ara està preparat per l'activació per DAG i calci (Parekh *et al.*, 2000; Newton, 2003).

2. Activació: el domini C1 com a sensor de DAG.

L'estimulació de receptors tirosina quinases o receptors acoblats a proteïna G (GPCR), fa augmentar els nivells de calci i DAG intracel·lulars. La fosfolipasa C γ (PLC γ), en el cas de tirosina quinases o PLC β en el cas de GPCR, són les encarregades de convertir els lípids fosfatidilinositol 4, 5-bisfosfat de la membrana en el segon missatger soluble inositol trifosfat i el lípid de membrana DAG. La producció de DAG es pot donar mitjançant altres mecanismes, que encara estan poc caracteritzats. L'augment dels nivells de DAG serveix per reclutar de manera reversible les cPKC i nPKC a la membrana a través del seu domini C1, en el domini regulador. A més, les PKC clàssiques s'uneixen a la membrana a través del lloc d'unió a calci del domini C2, que junt amb la unió del DAG al domini C1 afavoreix una interacció d'alta afinitat entre la PKC i la membrana. A la membrana, les PKC sofreixen un canvi conformacional que exposa els llocs d'unió als substrats i a les proteïnes d'ensamblatge i ancoratge i això dóna lloc a l'activació de l'enzim (Orr *et al.*, 1992). Les nPKC només responen a DAG i les seves fosforilacions es poden donar a través de mecanismes diferents (Ziegler *et al.*, 1999; Freeley *et al.*, 2005). Les PKC atípiques no responen a calci ni a DAG però també poden regular-se per fosforilacions en resposta a estímuls externs (Standaert *et al.*, 2001).

3. Inactivació: proteòlisi i degradació.

La conformació madura i activa unida a la membrana cel·lular és altament sensible a fosfatases, de manera que unions prolongades a la membrana provoquen la defosforilació de les PKC per PHLPP i PP2A, i la seva subseqüent degradació (Gao *et al.*, 2008; Newton, 2009). La unió de Hsp70 al motiu del gir defosforilat del extrem C-terminal, estabilitza l'enzim i permet que sigui refosforilat, entrant un altre cop al cicle (Lee *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 1998). Si la PKC no és rescatada per la Hsp70, sofreix ubiquitinació per les E3-ligases, com per la recent descoberta RINCK (Chen *et al.*, 2007), i és degradada.

La fosforilació és un pas que es dóna en les cèl·lules sense estimular, de manera constitutiva, mentre que la translocació a membrana i la degradació són passos dependents dels nivells de segons missatgers, en resposta a la unió de lligands als receptors de membrana.

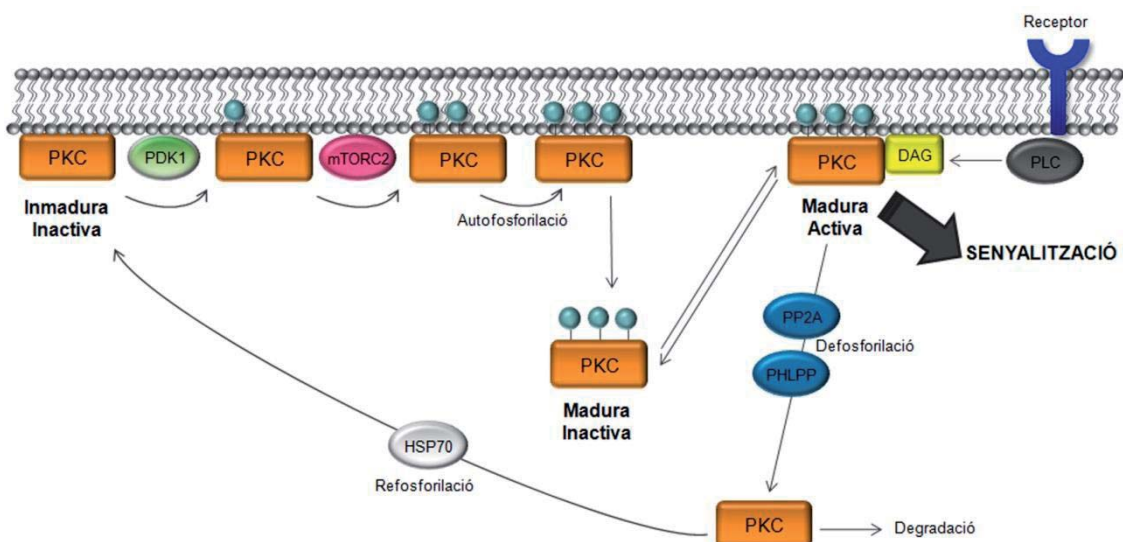


Figura I.11. Mecanismes d'activació i inactivació de PKC (Adaptat de Griner *et al.*, 2007 i Newton, 2009).

2.1.4. FUNCIONS DE LES ISOFORMES DE PKC.

Durant els últims anys, s'ha aprofundit en l'estudi de la funció de cada una de les isoformes de PKC, i s'ha vist que cada una té funcions diferents segons el tipus cel·lular i l'estímul. S'ha vist que els isoenzims de PKC poden tenir papers oposats en proliferació, supervivència i promoció de fenotip tumoral. Un exemple són les isoformes PKC δ i PKC ϵ . En la majoria de tipus cel·lulars, PKC δ és proapoptòtica i regula negativament la proliferació, tot i que en alguns casos pot regular respostes mitogèniques. D'altra banda, PKC ϵ és promitogènica i afavoreix la supervivència cel·lular (revisat a (Griner *et al.*, 2007). En càncer, fa anys que es coneix que les PKC juguen un paper en la tumorigènesi, gràcies als estudis del paper promotor de tumors del PMA, i actualment hi ha molts estudis que avaluen la correlació entra la senyalització per PKC i el càncer. Sorprenentment, només hi ha descrita una mutació en la família de les PKC associada al càncer. Es tracta d'una mutació en un nucleòtid (D294G), descrita en una subpoblació de tumors pituïtaris i en adenomes i carcinomes fol·liculars de la tiroides (Alvaro *et al.*, 1993; Prevostel *et al.*, 1997). Sí que s'han observat alteracions en l'expressió de les isoformes en molts tumors. Així, es creu que una alteració en el balanç d'expressió de les diferents isoformes contribueix al desenvolupament del fenotip tumoral.

2.2. FOSFATIDILINOSITOL 3-QUINASA (PI3K).

Les fosfatidilinositol 3-quinases (PI3Ks) són membres d'una família única i conservada de quinases lipídiques intracel·lulars, que en resposta a estímuls extracel·lulars fosforilen l'hidroxil de la posició 3 de l'anell dels fosfatidilinositols (PdtIns=PI) de la membrana lipídica, donant lloc als fosfatidilinositols-3-fosfat (PdtIns3P) (Figura I.12). Aquests actuen com a segons missatgers en la transducció de senyals i donen lloc a l'activació de moltes xarxes de senyalització intracel·lulars que regulen funcions tan diverses com el creixement cel·lular, la supervivència, el remodelament del citoesquelet i el tràfic intracel·lular entre orgànuls.

2.2.1. CLASSIFICACIÓ I ESTRUCTURA.

Les PI3K es poden dividir en tres subgrups (classe I, II i III), segons la seva estructura i la seva especificitat pel substrat (Taula I.1):

CLASSE	SUBUNITAT CATALÍTICA	SUBUNITAT REGULADORA	SUBSTRATS <i>IN VITRO</i>
IA	p110 α , β , δ	p85 α , p55 α , p50 α , p85 β , p55 γ	PI-4,5-P ₂ , PI-4-P, PI-5-P ₂
IB	p110 γ	p101, p84, p87PIKAP	PI-4,5-P ₂ , PI-4-P, PI
II	PI3KC2 α , β , γ		PI, PI-4-P
III	Vsp34		PI

Taula I.1. Classificació de la família PI3K

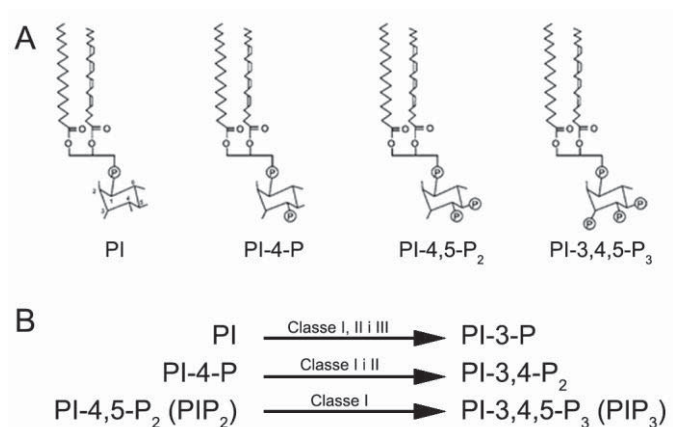


Figura I.12. Els fosfatidilinositols. (A) Estructura dels fosfatidilinositols. (B) Diferents preferències de substrat *in vitro* de les classes de PI3K (adaptat de Hawkins *et al.*, 2006).

Classe I

La classe I es divideix en dues subfamílies, segons a quins receptors de membrana s'uneixen. La classe IA s'activa per vies iniciades per receptors de tirosina quinases (RTKs), mentre que la classe IB s'activa a partir de receptors acoblats a proteïna G (GPCRs) (Figura I.13).

- **Classe IA**

Les PI3K de classe IA consisteixen en un heterodímer format per una subunitat reguladora p85 i una subunitat catalítica p110. Tres gens, PIK3R1, PIK3R2 i PIK3R3 codifiquen per les isoformes reguladores de p85: p85 α , p85 β , p55 γ respectivament. A més, el gen PIK3R1 codifica per dues isoformes més curtes, p55 α , p50 α , a través de llocs alternatius d'iniciació de la transcripció. Aquestes isoformes reguladores tenen una estructura comú: un domini d'unió a la unitat catalítica p110, amb un domini d'homologia 2 a SRC (anomenat SH2) a cada costat. Les isoformes p85 α i p85 β , tenen a més una regió N-terminal més llarga, que conté un domini d'homologia 3 a SRC (anomenat SH3) i un domini d'homologia al BCR (BH), envoltat per dues regions riques en prolines.

La subunitat p85 és crucial en mitjançar l'activació de la classe IA pels RTKs. Els dominis SH2 de p85 s'uneixen als residus tirosina fosforilats dels RTKs activats o a molècules adaptadores (com IRS1). Aquesta unió allibera la subunitat p110 de la regulació basal negativa per p85, i recluta el heterodímer p85-p110 al seu substrat PI-4,5-P₂ a la membrana plasmàtica.

Tres gens, PI3CA, PI3CB i PI3CD codifiquen per les isoformes catalítiques p110 α , β , δ respectivament. Contenen un domini d'unió a p85 N-terminal que interacciona amb la subunitat reguladora p85, un domini d'unió a Ras que facilita l'activació per la GTPasa Ras, un domini C2, un domini d'homologia a fosfatidilinositol quinasa (PIK) i un domini catalític C-terminal (Figura I.14).

Recentment s'ha descrit que en macròfags, p110 β també pot senyalitzar en resposta a l'activació de receptors acoblats a proteïna G, i és funcionalment redundat a p110 γ (Guillemet-Guibert *et al.*, 2008), que es troba expressada majoritàriament en leucòcits. Això permet que en totes les cèl·lules hi hagi una isoforma de PI3K capaç de respondre als estímuls que senyalitzen via GPCRs.

- **Classe IB**

La classe IB de les PI3K consisteix en un heterodímer format per una subunitat reguladora p101 i la subunitat catalítica p110 γ (Figura I.14). La subunitat reguladora p101 facilita l'activació del heterodímer p101-p110 γ pels receptors acoblats a proteïna G.

A més, s'han descrit dos homòlegs de p101, anomenats p84 i p87PIKAP, indicant que les PI3K de classe IB podrien tenir altres formes de regulació desconegudes fins ara (Suire *et al.*, 2005; Voigt *et al.*, 2006).

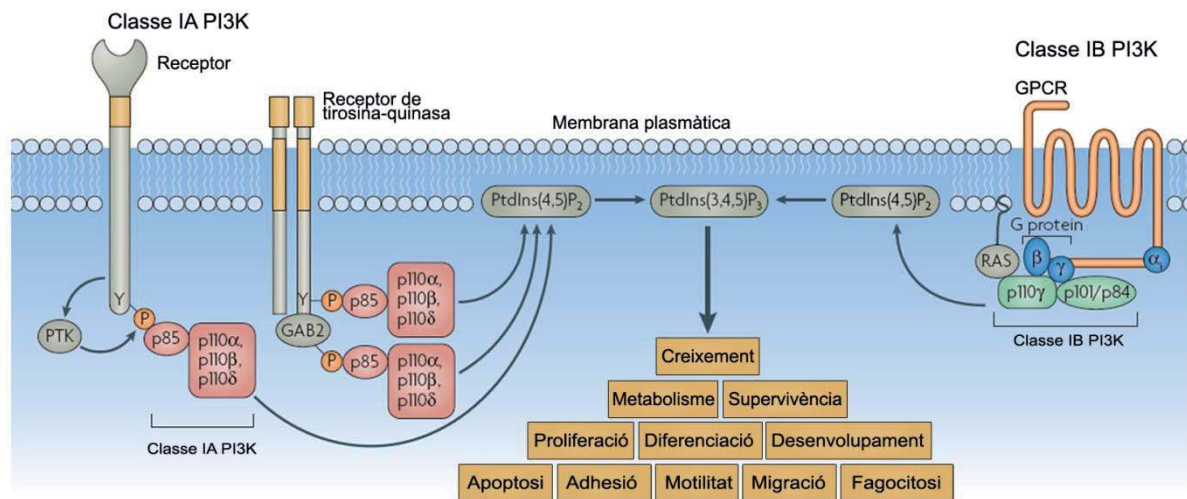


Figura I.13. Mecanisme d'activació de les PI3K de Classe I. Després de l'estimulació cel·lular totes les PI3K de classe I són reclutades a la part interior de la membrana plasmàtica, on generen PIP₃. Les isoformes de classe I de PI3K (p110α, p110β, p110δ) s'uneixen directa o indirectament als receptors a través de la interacció amb les seves subunitats reguladores p85 amb motius de reconeixement fosforilats en tirosines als dominis citoplasmàtics dels receptors, o amb adaptadors solubles com GAB2 (GRB2-associated binding protein). L'única PI3K de classe IB, p110γ, és reclutada per receptors acoblats a proteïna G (GPCRs) per interacció directa amb les subunitats de la proteïna G, a través del domini catalític de p110 i de les subunitat reguladores. RAS, en el seu estat actiu unit a GTP també s'uneix directament a la subunitat p110γ de la PI3Kγ regulant la seva activitat catalítica. Totes les PI3K de classe I generen els segons missatgers PIP₃ a la membrana, que serveix de plataforma d'ancoratge per les proteïnes amb dominis d'homologia a plecstrina (com Akt), i altres dominis. Això inicia una cascada de fosforilacions i d'interaccions proteïna-proteïna que tindran com a diana el control de múltiples processos biològics (adaptat de Rommel *et al.*, 2007).

Classe II

Els membres de la classe II consisteixen en una sola subunitat catalítica p110-like. Són proteïnes d'elevat pes molecular i contenen, a més dels dominis catalítics, dos dominis C2, que afavoreixen la interacció amb la membrana plasmàtica (Figura I.14). Preferentment fosforilen PI i PI-4-P.

Classe III

També s'anomena hVps34. Només conté el domini catalític, un domini PIK, i un domini C2, i només fosforila PI (Figura I.14). Es va identificar originalment en llevat (*budding yeast*) com un producte necessari pel tràfic de vesícules de l'aparell de Golgi a la vacuola. S'ha descrit que poden activar la via mTOR en presència d'aminoàcids (Nobukuni *et al.*, 2005). Així que sembla que la classe III també estaria implicada en la regulació del creixement cel·lular, com la resta de membres de la família. A més, Vsp34 ha estat implicat en autofàgia, un procés cel·lular en resposta a la manca de nutrients (Backer, 2008).

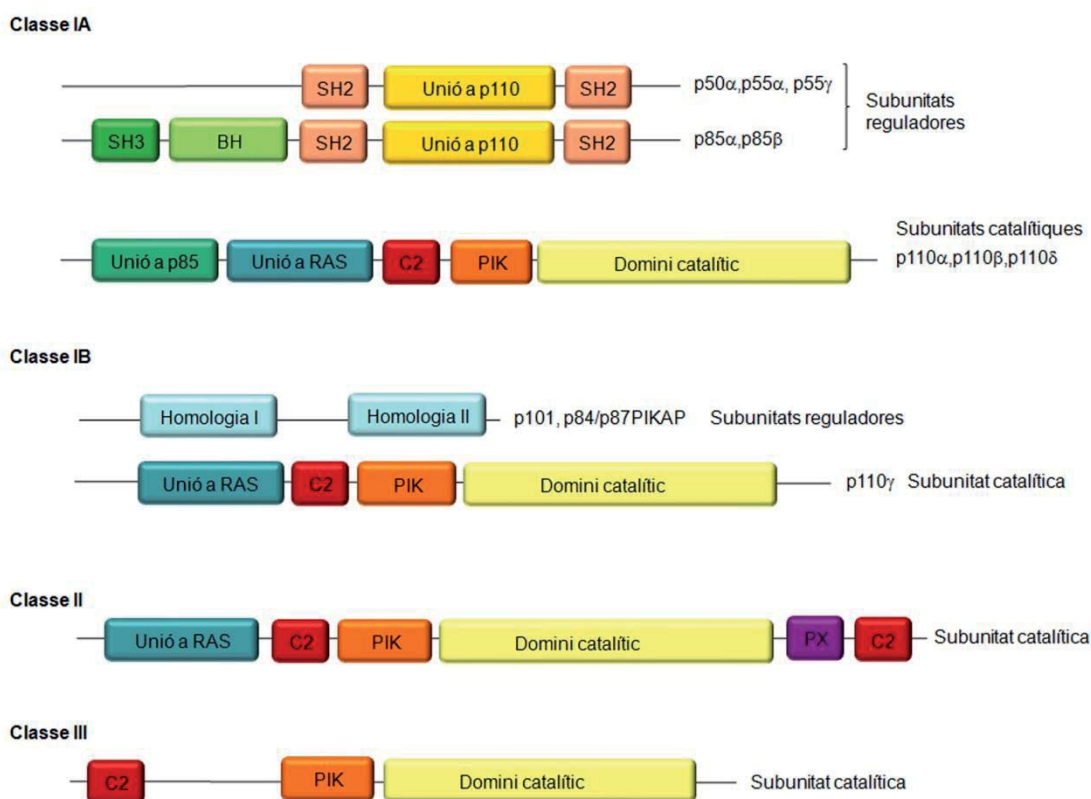


Figura I.14. Estructura de les isoformes de la família de PI3K (adaptat d'Engelman *et al.*, 2006).

2.2.2. SENYALITZACIÓ.

Les funcions de PI3K inclouen la regulació de l'homeòstasi de la glucosa, metabolisme, creixement, proliferació i supervivència (Taula I.2). A partir dels estudis amb ratolins transgènics i amb inhibidors selectius s'han descrit papers específics per a cada una de les isoformes, tot i que hi ha funcions que es solapen, amb la conseqüent implicació per la toxicitat i eficàcia dels nous inhibidors selectius per les isoformes. En termes generals, p110 α i p110 β s'expressen de manera ubiqua i regulen la proliferació cel·lular i la senyalització per insulina. p110 δ i p110 γ , s'expressen majoritàriament en leucòcits, i semblen estar involucrades en la regulació del sistema immune i la inflamació (Markman *et al.*, 2009).

La diferent distribució cel·lular de les isoformes de PI3K és un factor clau a l'hora de determinar les seves funcions biològiques. No és sorprenent que els ratolins *knock-out* de p110 α i p110 β siguin letals en estadis embrionaris, indicant que p110 α i p110 β tenen papers no redundants durant el desenvolupament embrionari (Vanhaesebroeck *et al.*, 2005). Els ratolins heterozigots són viables, fet que indica que nivells baixos d'aquestes isoformes són suficients pel desenvolupament. Els ratolins *knock-out* de p110 δ i p110 γ són viables, fèrtils i aparentment sans, i amb una supervivència normal. Però tots dos ratolins *knock-out*, amb tot el gen deletat, i els ratolins amb mutacions en els dominis quinasa (p110 δ Asp90Ala i p110 γ Lys833Arg) mostren fenotips severament alterats quan el seu sistema immune sofreix un estrès agut (Hirsch *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2000; Sasaki *et al.*, 2000; Clayton *et al.*, 2002; Jou *et al.*, 2002; Okkenhaug *et al.*, 2002; Vanhaesebroeck *et al.*, 2005).

La desregulació de la via de PI3K és crucial per la patofisiologia de varies malalties: una senyalització atenuada en resposta al receptor d'insulina contribueix a l'aparició de diabetis tipus 2, mentre que les mutacions que amplifiquen la senyalització via PI3K es troben entre les alteracions més comuns en càncer.

Només les PI3K de classe IA i IB són capaces de generar PI-3,4,5-P₃ (també anomenats PIP₃), que actuen com a segons missatgers (veure figura I.12). En contrast amb altres fosfoinositols, els PIP₃ es troben en nivells indetectables en una cèl·lula sense estimular, i augmenten de manera transitòria quan s'estimula la cèl·lula (Rommel *et al.*, 2007). Una característica de la majoria de les proteïnes activades per PI és la presència d'un domini d'homologia a plecstrina (PH), un domini d'uns 100-200 aminoàcids. Entre les proteïnes que tenen PH es troben Akt/PKB (és una de les dianes més importants de PI3K), PDK1, PKC, petites GTPases i membres de la família de les tirosina-quinases TEC (Marte *et al.*, 1997; Chan *et al.*, 1999). Altres dominis a través dels quals les proteïnes es poden unir als fosfoinositols són: FYVE, Phox (PX), C1 i C2, entre d'altres (Hennessy *et al.*, 2005).

ISOFORMA	FUNCIÓ
p110 α	<p>Deleció associada amb defectes en la proliferació de embrions murins i mort als 10 dies (Bi <i>et al.</i>, 1999)</p> <p>Mutada/amplificada en càncers humans (Samuels <i>et al.</i>, 2004; Karakas <i>et al.</i>, 2006)</p> <p>Constitutivament activa dóna cardiopatia en ratolins (Oudit <i>et al.</i>, 2004)</p> <p>Essencial pel desenvolupament vascular (Graupera <i>et al.</i>, 2008)</p> <p>Fagocitosi i pinocitosi de fase fluida de grans molècules per macròfags (Tamura <i>et al.</i>, 2009)</p> <p>Regulació de la contractilitat a través del canal de calci de tipus L dependent de voltatge en miòcits (Lu <i>et al.</i>, 2009)</p> <p>Senyalització d'insulina (Knight <i>et al.</i>, 2006)</p> <p>Regulació de l'assemblatge d'actina i de la migració cel·lular induïts per BMPs (Gamell <i>et al.</i>, 2008)</p>
p110 β	<p>Defectes en la sensibilitat a insulina i l'homeòstasi de glucosa al fetge de ratolins KO, independent de la funció quinasa (Jia <i>et al.</i>, 2008)</p> <p>Necessària per l'apoptosi i la fagocitosi induïda pel receptor FcR per macròfags (Leverrier <i>et al.</i>, 2003)</p> <p>Quimiomotaxi de cèl·lules vasculares de múscul llis (Campbell <i>et al.</i>, 2004)</p> <p>Motilitat de la cèl·lula cancerosa (Yip <i>et al.</i>, 2004)</p> <p>Formació del trombe de plaquetes (Jackson <i>et al.</i>, 2005)</p> <p>Deleció associada a una profunda reducció en la proliferació cel·lular i mort als 3-7 dies (Vanhaesebroeck <i>et al.</i>, 2005)</p> <p>Regulació de la duplicació de l'ADN de manera dependent i independent de la funció quinasa (Marques <i>et al.</i>, 2009)</p>
p110 δ	<p>Funció i desenvolupament de les cèl·lules B i senyalització del receptor d'antigen de cèl·lules B i T (Okkenhaug <i>et al.</i>, 2002; Al-Alwan <i>et al.</i>, 2007; Okkenhaug <i>et al.</i>, 2007)</p> <p>Senyalització del receptor de IL-4 i resposta a BAFF (Bilancio <i>et al.</i>, 2006; Henley <i>et al.</i>, 2008)</p> <p>Producció d'anticossos (Clayton <i>et al.</i>, 2002; Jou <i>et al.</i>, 2002; Okkenhaug <i>et al.</i>, 2002)</p> <p>La depleció augmenta les respostes IgE de les cèl·lules B (Zhang <i>et al.</i>, 2008)</p> <p>To del múscul llis arterial i hipertensió (Northcott <i>et al.</i>, 2005)</p> <p>Migració de neutròfils i preparació per l'esclat de neutròfils (fase II) (Condliffe <i>et al.</i>, 2005; Nashed <i>et al.</i>, 2007)</p> <p>Proliferació cel·lular en leucèmia mieloide aguda (Sujobert <i>et al.</i>, 2005)</p> <p>Expressada en cèl·lules endotelials (Geng <i>et al.</i>, 2004)</p> <p>El ratolí mutant <i>knock-in</i> inactiu té afectada la immunitat (Okkenhaug <i>et al.</i>, 2002)</p>
p110 γ	<p>Preparació per l'esclat de neutròfils (fase I) (Condliffe <i>et al.</i>, 2005)</p> <p>Reclutament dels neutròfils i macròfags als llocs d'inflamació i resposta a l'estímul inflamatori (Hirsch <i>et al.</i>, 2000)</p> <p>Respostes patològiques de cèl·lules acinars pancreàtiques (Gukovsky <i>et al.</i>, 2004)</p> <p>Migració de cèl·lules dendrítiques (Del Prete <i>et al.</i>, 2004)</p> <p>Activació de cèl·lules T (Li <i>et al.</i>, 2000; Sasaki <i>et al.</i>, 2000)</p> <p>Els embrions del ratolí <i>knock-out</i> són viables, amb una contractilitat del miocardi augmentada (Vanhaesebroeck <i>et al.</i>, 2005)</p> <p>Pot tenir un paper perjudicial en la insuficiència cardíaca (Perrino <i>et al.</i>, 2005)</p>

Taula I.2. Funcions específiques de les isoformes de PI3K.

2.2.3. SUBSTRATS DE PI3K.

2.2.3.1. PDK1 (*PI3K-Dependent Kinase 1*).

PDK1 va ser descrita i clonada el 1997, quan es buscava la quinasa responsable de l'activació d'Akt de manera dependent de PI3K (Alessi *et al.*, 1997). Actualment, PDK1 es considera la reguladora de la superfamília de proteïnes ACG. PDK1 fosforila i activa membres d'aquesta família de quinases regulant el creixement cel·lular, la supervivència i el metabolisme. Entre els seus substrats es troben: Akt, *p70 ribosomal S6 kinase* (S6K), *p90 ribosomal S6 kinase* (RSK), *serum and glucocorticoid induced kinase* (SGK), i algunes isoformes de PKC (Bayascas, 2008). S'expressa de manera ubíqua en tots els tipus cel·lulars i sembla que es troba constitutivament activa en condicions basals (Alessi *et al.*, 1997; Pullen *et al.*, 1998; Casamayor *et al.*, 1999).

PDK1 és una serina/treonina quinasa de 63 kDa. Posseeix dos dominis regulatoris: un domini d'homologia a plecstrina (PH) que s'uneix als PIP₃, i un domini d'unió a substrats anomenat butxaca-PIF. La unió de PDK1 als PIP₃ és essencial per la correcta activació de les isoformes d'Akt, i també pel manteniment d'una mida normal i la sensibilitat a insulina. En canvi, el domini butxaca-PIF no és necessari per l'activació d'Akt, però sí per l'activació de la resta de substrats (Bayascas, 2008).

Quan la cèl·lula rep un senyal de factors de supervivència o d'insulina, s'activa la PI3K, i Akt i PDK1 són reclutades a la membrana plasmàtica, on colocalitzen, gràcies a la seva habilitat per unir-se als PIP₃ generats *de novo*. La unió d'Akt als PIP₃ indueix un canvi conformacional que o bé crea un espai per la interacció amb PDK1 o bé exposa el residu Thr308 del domini catalític, que indueix la seva fosforilació per PDK1. En canvi, la resta de substrats de PDK1 no tenen domini PH i no s'uneixen als PIP₃, i són fosforilats per PDK1 mitjançant mecanismes diferents, que inclouen la fosforilació del domini C-terminal per altres quinases, com mTOR (Bayascas, 2008).

2.2.3.2. Akt/PKB.

La proteïna quinasa B (PKB), o Akt, és l'homòleg en mamífers de l'oncogen viral *v-Akt*, causant del limfoma de cèl·lules T de ratolí (Staal *et al.*, 1977). Pertany a la superfamília de quinases AGC (*cAMP-dependent, cGMP-dependent and protein kinase C*).

2.2.3.2.1. ESTRUCTURA.

Hi ha tres isoformes codificades per diferents gens: Akt1/ α , Akt2/ β i Akt3/ γ . Akt1 s'expressa en nivells bastant elevats de manera ubiqua, excepte en ronyó, fetge i melsa. L'expressió d'Akt2 varia segons l'òrgan, amb expressió més elevada en múscul esquelètic, òrgans intestinals i teixits reproductors. Akt3 no es detecta en aquells teixits on Akt1 i Akt2 són abundants, però la seva expressió és alta en cervell i testicles. Com que les tres isoformes s'activen en les mateixes circumstàncies i tenen els mateixos substrats, s'havia postulat que les tres isoformes d'Akt eren funcionalment redundants (Franke *et al.*, 2003). Però a mesura que han anat sorgint ratolins modificats genèticament, on s'ha silenciat l'expressió de cada una de les isoformes, s'ha vist que cada isoforma juga un paper específic en diferents processos cel·lulars. Els ratolins *knock-out* per una isoforma d'Akt són viables i mostren fenotips subtils, però els dobles *KO* Akt1/Akt2 i Akt1/Akt3 són letals a nivell embrionari. Akt1 sembla que és la isoforma més important en el desenvolupament embrionari i supervivència postnatal. Els ratolins deficients d'Akt2 tenen defectes en l'homeòstasi de glucosa mentre que els deficients d'Akt3 mostres defectes en desenvolupament del cervell (revisat a Dummler *et al.*, 2007).

Totes tres Akt tenen una estructura comú, que consisteix en un domini d'homologia a plecstrina (PH) a l'extrem NH₂-terminal, que interacciona amb els productes lipídics fosforilats per la PI3K (sobretot PIP₃), sintetitzats a la membrana plasmàtica. A continuació hi ha un domini quinasa central i un motiu hidrofòbic (MH) a l'extrem C-terminal. S'ha descrit que per la total activació d'Akt, és necessària la fosforilació de dos residus: Ser473, situat al MH, i Thr308 situat al T-loop del domini quinasa (Figura I.15).

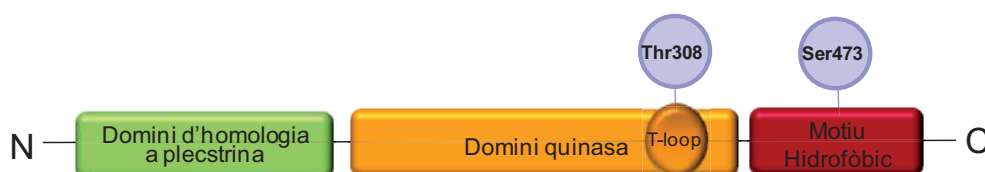


Figura I.15. Estructura d'Akt.

2.2.3.2.2. REGULACIÓ.

Akt es troba en una conformació inactiva al citoplasma. Quan la PI3K produeix PIP₃, Akt és reclutada a la membrana, on s'uneix als fosfolípids a través del domini PH. La unió d'Akt als fosfolípids generats per PI3K és crítica per l'activació d'Akt *in vivo* (Franke *et al.*, 1995; Franke *et al.*, 1997; Klippel *et al.*, 1997; Bellacosa *et al.*, 1998; Sable *et al.*, 1998). El mecanisme d'aquesta translocació del citoplasma a la membrana plasmàtica es desconeixia, però molt recentment s'ha descrit que Akt és diana de l'E3 ubiquitina lligasa TRAF6, i que gràcies a la ubiquitinació, TRAF6 promou la translocació d'Akt (Yang *et al.*, 2009).

Aquesta relocalització a la membrana plasmàtica aproxima Akt a les quinases que la fosforilaran i l'activaran. Alessi i col·laboradors van identificar 4 llocs de fosforilació (Ser124, Thr308, Thr450 i Ser473) en Akt1 que eren fosforilats *in vivo*. Ser124 i Thr450 estaven basalment fosforilats, mentre que la Thr308 i la Ser473 es fosforilaven després del tractament de les cèl·lules amb un estímul extern (Alessi *et al.*, 1996). Actualment es considera que la fosforilació en aquests dos residus és necessària per la completa activació d'Akt.

El residu Ser473 és fosforilat per una quinasa que es va anomenar PDK2. Aquesta fosforilació indueix un canvi de conformació que facilita la fosforilació del residu Thr308 per la PDK1, que està constitutivament activa i gràcies al seu domini PH és reclutada a la membrana citoplasmàtica junt amb Akt. Un cop activa, Akt migra cap al citosol i el nucli, on fosforila proteïnes implicades en el control de l'apoptosi, la proliferació i el creixement cel·lular (Manning *et al.*, 2007). Tot i que la fosforilació del MH no és imprescindible per la fosforilació en Thr308, sembla que promou i estabilitza la proteïna i facilita l'actuació de PDK1. A més, encara no s'ha trobat cap estímul fisiològic que resulti en la fosforilació en Thr308 sense fosforilació en Ser473 (Manning *et al.*, 2007) (Figura I.16).

La identitat de la quinasa PDK2 ha estat desconeguda durant molts anys, i s'han proposat diferents candidates, entre elles *integrin-kinked kinase* (ILK) (Persad *et al.*, 2001), *mitogen-activated protein kinases* (MAPK)-*activated protein kinase 2* (MK2) (Alessi *et al.*, 1996), *DNA-dependent protein kinase* (DNA-PK) (Feng *et al.*, 2004), PKC β (Kawakami *et al.*, 2004), i Rictor-mTOR (Sarbasov *et al.*, 2005). Els últims estudis senyalen que mTORC2 fosforila Akt en condicions de creixement i estimulació per mitògens, mentre que DNA-PK fosforila Akt en situacions d'estrés, com per exemple després de dany al DNA o en presència de ADN CpG (Bozulich *et al.*, 2009). A més, sembla que segons quina sigui la quinasa d'Akt en Ser473, els substrats que s'activaran poden variar. Per exemple, si la fosforilació és a través de DNA-PK, Akt fosforilarà GSK3 i FoxO4, però no FKHRL1 (revisat a Bozulich *et al.*, 2009). Així, no es descarta la participació d'altres quinases en la fosforilació d'Akt en determinades situacions cel·lulars.

S'ha descrit que Akt s'associa a algunes proteïnes que regulen la seva activitat. Una d'elles és la família de proteïnes TCL1 (*T-cell leukemia 1*). TCL1 augmenta l'activitat d'Akt formant complexos heterodimèrics a la membrana citoplasmàtica, i té propietats oncogèniques que

semblen estar lligades a la seva capacitat d'unir-se a Akt. Hi ha controvèrsia sobre si la unió de TCL-1 i Akt augmenta la fosforilació d'aquesta última en els residus Ser473 i Thr308, però si que és clar que la fosforilació dels substrats d'Akt augmenta quan aquesta unió es dona (Teitell, 2005).

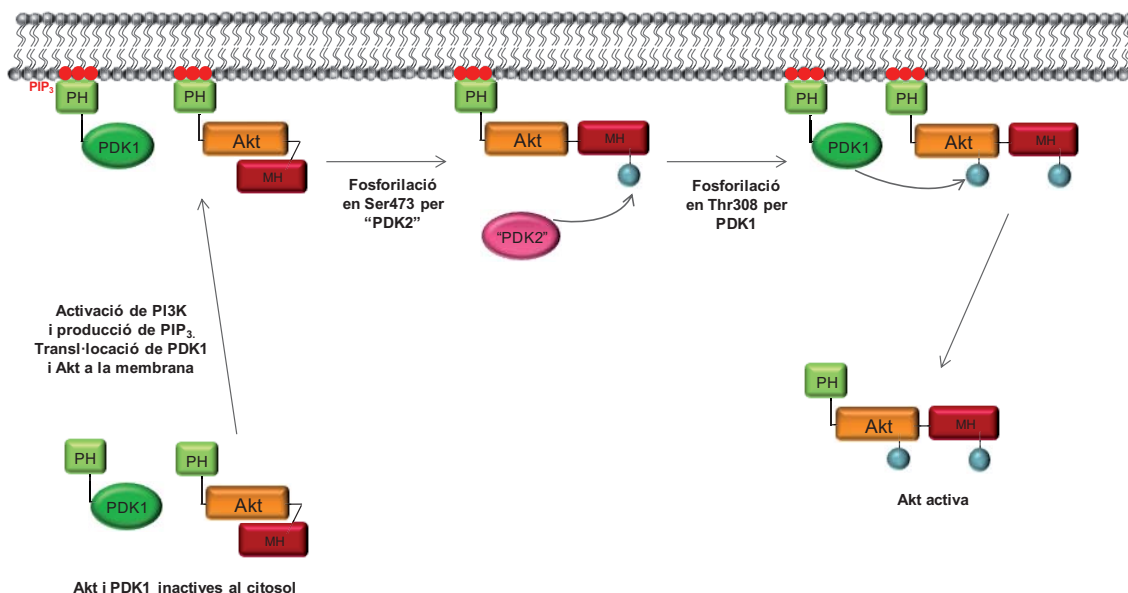


Figura I.16. Regulació d'Akt. Akt i PDK1 es troben en una conformació inactiva al citosol. Quan s'actua PI3K, i es produeixen PIP₃, totes dues proteïnes migren a la membrana citoplasmàtica, on Akt és fosforilada en primer lloc en Ser473 per "PDK2" i en segon lloc, en Thr308 per PDK1. Un cop Akt es troba fosforilada en els dos residus, i està en la conformació activa, Akt migra cap al citosol i el nucli.

2.2.3.2.3. SUBSTRATS.

La seqüència que defineix el motiu mínim de reconeixement per Akt es va identificar fa uns anys, just després de la identificació de GSK3 com la primera diana directa d'Akt (Cross *et al.*, 1995). La seqüència de fosforilació d'Akt és R-X-R-X-S/T-B (Alessi *et al.*, 1996), on X representa qualsevol aminoàcid i B representa un aminoàcid hidrofòbic.

Akt regula moltes funcions cel·lulars, com angiogènesi, migració i invasió cel·lular, metabolisme, entre d'altres, però en aquesta memòria només descriurem les dianes implicades en supervivència cel·lular i apoptosi, creixement cel·lular i síntesi de proteïnes, i proliferació cel·lular (Figura I.17, Taula I.3).

- **Supervivència cel·lular i apoptosi**

Akt potencia la supervivència cel·lular bloquejant la funció de proteïnes proapoptòtiques. En primer lloc, Akt fosforila i inhibeix la proteïna BH3-*only* BAD en el residu Ser136, creant un lloc d'unió per les proteïnes 14-3-3, i per tant, impeding la unió de BAD amb altres proteïnes (Datta *et al.*, 1997). Akt també inhibeix l'activitat proapoptòtica de BAX, fosforilant-lo. Aquesta fosforilació promou la seva heterodimerització amb MCL-1 i BCL-XL al citosol, impeding la seva oligomerització al mitocondri (Gardai *et al.*, 2004; Xin *et al.*, 2005).

Akt també inhibeix l'expressió de les proteïnes BH3-*only* a través d'efectes en factors de transcripció, com la família FoxO i p53. Akt fosforila FoxO1 en els residus Thr24, Ser256 i Ser319, i fosforila FoxO3a i FoxO4 en tres residus equivalents (revisat a Tran *et al.*, 2003). Aquestes fosforilacions es donen al nucli, i marquen les proteïnes FoxO per la unió amb les proteïnes 14-3-3, que les exporten al citoplasma, impeding la seva acció com a factors de transcripció. Així, Akt bloqueja la transcripció de gens diana de FoxO. Dos dels més importants en l'apoptosi són BIM (Dijkers *et al.*, 2000) i el lligand de Fas (FasL) (Brunet *et al.*, 1999). També s'ha descrit que FoxO3 regula la transcripció de PUMA en resposta a la deprivació de nutrients i/o citoquines (You *et al.*, 2006).

Una altra diana d'Akt és MDM2, una E3 ubiquitina lligasa que indueix la degradació de p53. Akt fosforila MDM2 en els residus Ser166 i Ser186, i promou la seva translocació al nucli, on regula negativament la funció de p53 (Mayo *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2001b). Dues dianes transcripcionals de p53 són PUMA i NOXA, que semblen essencials en l'apoptosi induïda per p53 (Villunger *et al.*, 2003).

Akt fosforila les dues isoformes de GSK3 en una regió regulatòria N-terminal, en un residu altament conservat (GSK3 α -S21, GSK3 β -S9). Aquesta fosforilació inactiva GSK3 (Cross *et al.*, 1995; Alessi *et al.*, 1996). Es desconeixia com GSK3 participava en processos d'apoptosi, però s'ha descrit que GSK3 regula directament el membre antiapoptòtic de la família de BCL-2, MCL-1, fosforilant-lo en el residu Ser159 i afavorint la seva ubiquitinació i degradació pel proteasoma (Maurer *et al.*, 2006).

Una mica més avall de la cascada proapoptòtica, Akt fosforila la procaspasa-9 en el residu Ser196, i aquesta fosforilació correlaciona amb una disminució de l'activitat *in vitro* (Cardone *et al.*, 1998).

A més, Akt exerceix la seva activitat en la supervivència cel·lular de manera indirecta. Per exemple, sota determinades condicions, s'ha descrit que la via PI3K/Akt pot activar la supervivència a través de NF κ B (fosforilant IKK α), o inhibir-la a través de JNK/p38 (Ozes *et al.*, 1999; Romashkova *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2001). I tot que no estan revisats en aquesta memòria, Akt regula la supervivència cel·lular gràcies al seu paper en l'adquisició de nutrients, el metabolisme i el manteniment del potencial de membrana mitocondrial (revisat en Plas *et al.*, 2005).

- **Creixement cel·lular i síntesi de proteïnes**

Una de les funcions més conservades d'Akt és el seu paper en creixement cel·lular (per exemple, increment de massa cel·lular). El principal mecanisme sembla que és a través de l'activació de mTORC1, que és regulat per nutrients i factors de creixement (revisat en Wullschlegler *et al.*, 2006). Així, Akt activa a través de mTOR les proteïnes S6K1 i 4E-BP1 (*eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E)-binding protein 1*). S'ha descrit que Akt inhibeix TSC2, alliberant Rheb-GTP i permetent que activi mTORC1 (Manning *et al.*, 2007). Recentment, s'ha trobat un segon substrat d'Akt implicat en la regulació de mTORC1, PRAS40 (*proline-rich Akt substrate of 40 kDa*), que va ser identificat com el substrat fosforilat d'Akt més unit a 14-3-3 en resposta a insulina (Kovacina *et al.*, 2003).

- **Proliferació cel·lular**

L'activació d'Akt pot promoure la proliferació cel·lular a través de la fosforilació de p27Kip1 (*cyclin-dependent kinase inhibitor*) (Liang *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2002; Viglietto *et al.*, 2002), evitant la seva localització nuclear i afavorint el seu segrest per les proteïnes 14-3-3 al citosol. Akt també inhibeix l'expressió de p27 a través dels factors de transcripció FoxO (Medema *et al.*, 2000). També s'ha descrit que Akt fosforila l'inhibidor de ciclins p21Cip1/WAF1 en el residu Thr145, induint la seva localització citoplasmàtica (Zhou *et al.*, 2001a). Akt també pot inhibir l'expressió de p21 a través de l'activació de MDM2 i la subseqüent disminució de la transcripció de p21 mitjançada per p53 (Mayo *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2001b).

La diana d'Akt GSK3 fosforila les ciclins D i E i els factors de transcripció *C-MYC* i *C-JUN*, que juguen un paper central en la transició de la fase G1 a la S del cicle cel·lular. Al fosforilar-los, els marca per la seva degradació pel proteasoma. Així, Akt fosforilant i inhibint GSK3, facilita l'entrada al cicle cel·lular (revisat a Manning *et al.*, 2007).

- **Metabolisme**

En resposta a senyals de creixement, Akt regula l'entrada de nutrients i el metabolisme cel·lular de manera específica en cada tipus cel·lular. Una de les funcions fisiològiques més importants d'Akt és l'estimulació aguda de l'entrada de glucosa a la cèl·lula en resposta a insulina. Akt2, la isoforma predominant en teixits que responen a insulina, s'ha trobat associada al transportador de glucosa GLUT4 en vesícules (Calera *et al.*, 1998), i l'activació d'Akt afavoreix la translocació de GLUT4 a la membrana plasmàtica (Kohn *et al.*, 1996), sembla que a través de la fosforilació i inhibició de l'activitat GAP d'AS160 (Manning *et al.*, 2007).

Diana	Lloc de fosforilació en humans	Efecte	Diana	Lloc de fosforilació en humans	Efecte
FOXO1	T24, S256, S319	Inhibició	BAX	S184	Inhibició
FOXO3A	T32, S253, S315	Inhibició	MDM2	S166, S186	Activació
FOXO4	T32, S197, S262	Inhibició	Chk1	S280	Inhibició
TSC2	S939, T1462	Inhibició	eNOS	S1177	Activació
GSK3 α/β	S21/S9	Inhibició	ASK1	S83	Inhibició
RAF1	S259	Inhibició	IKK α	T23	Activació
PRAS40	T246	Inhibició	p21CIP1	T145	Inhibició
AS160	S588, T642	Inhibició	p27KIP1	T157	Inhibició
BAD	S99	Inhibició	Casp9	S196	Inhibició

Taula I.3. Llistat dels substrats d'Akt i els llocs de fosforilació. Es mostren alguns dels substrats dels que hi ha evidència *in vitro* i *in vivo* que són fosforilats per Akt (Adaptat de Manning *et al.*, 2007).

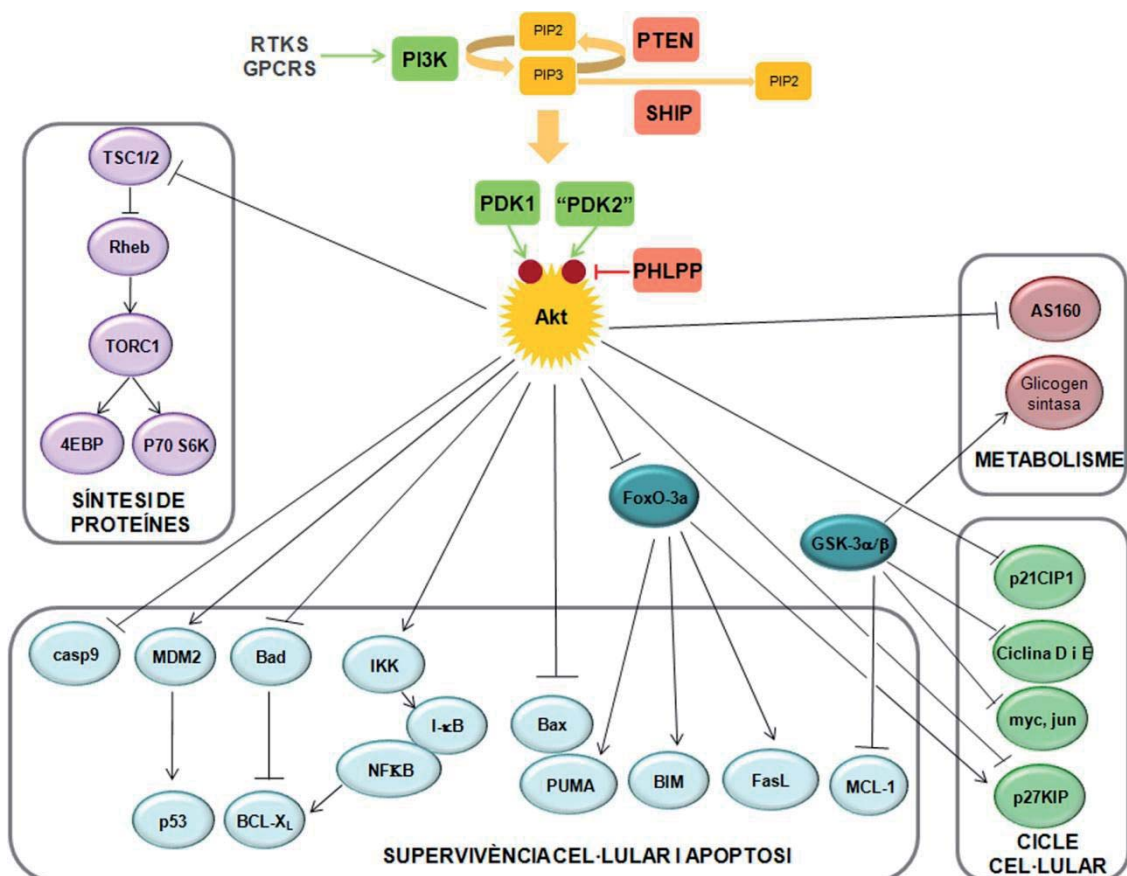


Figura I.17. Alguns dels substrats d'Akt i els seus efectes en la cèl·lula (adaptat de Manning *et al.*, 2007).

2.2.3.3. SGK3.

Les *serum and glucocorticoid-regulated protein kinases* (SGK) són una família de proteïnes estructuralment molt similars a Akt (comparteixen el 50% d'homologia amb Akt). S'uneixen als PIP₃ que genera PI3K a través d'un domini d'homologia Phox (PX), a diferència d'Akt i PDK1, que s'uneixen als PIP₃ a través d'un domini d'homologia a plecstrina (PH) (Tessier *et al.*, 2006).

Hi ha tres isoformes codificades per diferents gens: SGK-1, 2 i 3. SGK-1 es va identificar en un *screening* diferencial buscant gens induïbles per glucocorticoides en una línia cel·lular de tumor de mama en rata (Webster *et al.*, 1993). Posteriorment, s'ha descrit que l'ARNm de SGK1 augmenta amb altres estímuls (sèrum, aldosterona, TGFβ, transfecció amb p53, i estrès hiperosmòtic entre d'altres). SGK1 i 3 s'expressen de manera ubíqua, mentre que SGK2 només es troba al fetge, ronyó i pàncrees (Tessier *et al.*, 2006).

Recentment s'ha descrit que en línies amb PIK3CA mutat on hi ha poca fosforilació d'Akt, SGK3 podria estar implicada en la supervivència cel·lular induïda per aquesta activació oncogènica de PI3K (Vasudevan *et al.*, 2009). Així, PI3K estaria induint la supervivència cel·lular per vies dependents i independents d'Akt.

2.2.4. REGULACIÓ NEGATIVA DE LA VIA PI3K/AKT.

La senyalització de PI3K es regula negativament per l'acció de fosfatases específiques o bé per mecanismes de *feedback*.

2.2.4.1. FOSFATASES DE FOSOFATIDILINOSITOLS.

L'estimulació de les cèl·lules amb factors de creixement o insulina indueix una cascada de senyalització que resulta en la fosforilació transitòria dels PIP₂ per la PI3K, generant PIP₃, que són ràpidament defosforilats a PI-4,5-P₂ per PTEN o a PI-3,4-P₂ per les 5-fosfatases.

- **PTEN**

El gen supressor de tumors *PTEN* (*phosphatase with tensin homology, deleted on chromosome 10*), va ser originalment identificat com un gen mutat en molts tumors espontanis i en pacients amb predisposició a síndromes com la malaltia de Crowden.

PTEN és una fosfatasa dual, que defosforila tant proteïnes com substrats lipídics. PTEN regula negativament la via de PI3K, defosforilant la posició D3 de l'anell d'inositol dels PIP₃, formant l'inactiu PI-4,5-P₂. PTEN també pot actuar com a supressor de tumors a través de la seva habilitat per controlar la diferenciació cel·lular (Di Cristofano *et al.*, 1998), i en el nucli pot actuar de manera independent de la seva activitat fosfatasa, impactant en el cicle cel·lular, l'apoptosi i la integritat cromosomal (Salmena *et al.*, 2008).

- **5-FOSFATASES**

A més de defosforilar els PIP_3 generats per PI3K a $PI-3,4-P_2$, les 5-fosfatases també són capaces de defosforilar $PI-4,5-P_2$ a $PI-4-P$. S'han identificat 10 5-fosfatases en mamífers, i gràcies als ratolins *KO* es coneix que les 5-fosfatases regulen processos tan diversos com la proliferació de cèl·lules hematopoètiques (*SH2 (Src homology 2)-domain-containing inositol phosphatase* (SHIP1)), la recirculació de les vesícules sinàptiques, la senyalització d'insulina i l'homeòstasi de glucosa (SHIP2, SKIP (*skeletal muscle- and kidney-enriched inositol phosphatase*)) i *72-5ptase (72 kDa 5-ptase)/Type IV/Inpp5e (inositol polyphosphate 5-phosphatase E)*), l'endocitosi, el tràfic vesicular i la polimerització d'actina. Així doncs, mentre que PTEN finalitza la senyalització de PI3K, les 5-fosfatases són capaces de finalitzar i alhora continuar la senyalització iniciada per PI3K (revisat en Rohrschneider *et al.*, 2000; Ooms *et al.*, 2009).

2.2.4.2. PHLPP

Les PHLPP (*Pleckstrin homology (PH) domain leucine-rich repeat protein phosphatase*) van ser descobertes en una recerca racional de fosfatases que poguessin defosforilar Akt (Gao *et al.*, 2005). PHLPP1 i PHLPP2 defosforilen específicament el residu Ser473 en el motiu hidrofòbic d'Akt, donant lloc a una disminució en l'activitat d'Akt, un augment d'apoptosi i una inhibició en la proliferació cel·lular. Els efectes biològics de les PHLPP en Akt requereixen la presència del motiu d'unió PDZ (Gao *et al.*, 2005).

La família de fosfatases PHLPP comprèn tres membres: PHLPP1 α , PHLPP1 β i PHLPP2. PHLPP1 α i PHLPP1 β són variants de *splicing* d'un mateix gen. PHLPP1 i PHLPP2 tenen una estructura de dominis idèntica, amb un domini PH, seguit d'una regió rica en repeticions de leucina (LRR), un domini PP2C fosfatasa i un domini C-terminal PDZ. PHLPP1 i PHLPP2 es troben al citoplasma, nucli i membrana, i s'expressen en la majoria de teixits humans (Brognard *et al.*, 2008). Tot i que PHLPP1 i PHLPP2 defosforilen el mateix residu d'Akt, la Ser473, finalitzen la senyalització d'Akt regulant de manera diferent les tres isoformes d'Akt. Estudis en ratolins *KO*, han revelat que PHLPP1 regula específicament la fosforilació de HDM2 i GSK3 α a través d'Akt2, mentre que PHLPP2 modula específicament la fosforilació de p27 per Akt3 (Gao *et al.*, 2005; Brognard *et al.*, 2007).

2.2.4.3. MECANISMES DE FEEDBACK.

A més, dins de la via existeixen mecanismes de *feedback* per regular negativament la senyalització. Així, trobem que S6K, una de les dianes de mTOR, pot regular negativament IRS1, la molècula adaptadora que lliga el receptor de IRS1 (IRS1R) i PI3K. Aquest efecte sembla que és directe i impedeix a IRS1 associar-se al receptor d'insulina. Així es bloqueja la senyalització tot i l'estimulació del receptor d'insulina (Manning, 2004).

A més existeix la interacció amb altres vies de senyalització. Per exemple, la via de mTOR pot influir en la senyalització de PI3K via el *feedback* de S6K/IRS1 i via la fosforilació d'Akt mitjançada per mTORC2. O bé, la via de p53. La seva activació causa un augment de PTEN i una disminució de l'expressió de p110, induint la disminució de la senyalització de la via de PI3K.

2.2.5. MUTACIONS I ALTERACIONS DE PI3K/AKT EN CÀNCER.

Amb l'excepció de p53, la via de PI3K/Akt és la més mutada en càncer, i s'han descrit mutacions i aberracions que afecten a diversos components d'aquesta via. Les conseqüències de cada alteració depenen de quin component de la via està afectat i si altres gens o proteïnes estan concomitantment desregulats (Markman *et al.*, 2009).

La desregulació de la cascada pot ser deguda a aberracions genètiques, que resulten en una expressió disminuïda de PTEN o bé en una amplificació o mutació de PIK3CA, o una mutació o amplificació d'Akt.

PIK3CA, que codifica per p110 α , es troba mutat i amplificat en diversos càncers. Les mutacions es donen amb més freqüència en càncer de mama, colon, endometri, hepatocel·lular i glioblastoma, mentre que les amplificacions es donen en tumors de cervix, pulmó, gàstric, ovari i cap i coll (Markman *et al.*, 2009). El 80% de les mutacions es localitzen en dos *hot spots*, resultant en substitucions d'un sol aminoàcid: E545K i E542K en el domini helixal (exó 9) i H1047R en el domini quinasa (exó 20). Aquestes mutacions augmenten la funció enzimàtica i afavoreixen la senyalització, i promouen la transformació oncogènica *in vivo* i *in vitro*, tot i que es desconeix el mecanisme exacte.

L'amplificació d'Akt es dona en càncer de cap i coll, gàstric, pancreàtic i ovaris. Una mutació en E17K amb potencial de transformació s'ha trobat en una petita proporció de càncer de mama, colorectal i d'ovari (Carpten *et al.*, 2007). PTEN també pot trobar-se alterat en determinats tipus de tumors. La seva expressió disminuïda pot donar-se a través de varis mecanismes. La pèrdua d'heterogozitat (LOH, *loss of heterozygosity*) 10q es dona quan una còpia de PTEN és haploinsuficient i és incapaç de prevenir l'aparició d'un fenotip maligne. Es troben taxes altes de LOH en glioblastoma, càncer de pròstata, gàstric, d'endometri, de mama i melanoma. Es troben mutacions de PTEN en càncer d'endometri (hi ha un subtipus on es donen mutacions en un 80-90% de pacients) i glioblastoma.

3. LEUCÈMIA LIMFOCÍTICA CRÒNICA

3.1. DEFINICIÓ I EPIDEMIOLOGIA.

La Leucèmia Limfocítica Crònica de cèl·lules B (LLC) és una síndrome limfoproliferativa que es caracteritza per l'acumulació de limfòcits B circulants, funcionalment immadurs i que no proliferen.

Es va definir per primera vegada l'any 1966 com una malaltia caracteritzada per una expansió monoclonal de limfòcits B amb escassa capacitat de proliferació i una vida mitja llarga (Galton, 1966; Dameshek, 1967). Aquests limfòcits tenen una aparença madura, però són petits i immunològicament immadurs, i s'acumulen a l'organisme envaint preferentment sang perifèrica, moll d'os i ganglis limfàtics (Chiorazzi *et al.*, 2005). La producció deficient d'anticossos afavoreix l'aparició de processos infecciosos, sent les infeccions la causa de mort de entre un quart i la meitat de pacients amb LLC (Hamblin *et al.*, 2008).

Actualment es pensa que la LLC és una malaltia heterogènia, originada a partir de limfòcits B madurs estimulats per antigen, que expressen en la seva superfície els marcadors CD19, CD5, i CD23 i nivells reduïts de IgM, IgD, i CD79b (Chiorazzi *et al.*, 2005). Les cèl·lules de LLC poden arribar a representar el 99% de les cèl·lules mononucleades de sang perifèrica. La majoria de limfòcits circulants són quiescents, i estan aturats en la fase G₀ del cicle cel·lular. Les cèl·lules de LLC circulants poden sobreviure mesos, mentre que els limfòcits normals només sobreviuen dies. A més, no s'han trobat defectes en les vies de senyalització d'apoptosi *per se*, ja que les cèl·lules de LLC moren ràpidament quan es cultiven *in vitro*. Tot això suggereix l'existència de factors micro-ambientals que regulen la mort de les cèl·lules de LLC (Caligaris-Cappio *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2008).

La LLC és freqüent als països desenvolupats occidentals, on representa el 30% de les leucèmies i el 75% de les cròniques, mentre que en la població asiàtica representa només el 3-5% del total de les leucèmies diagnosticades (Montserrat *et al.*, 1995). Cada any es diagnostiquen uns 180.000 nous casos al món (Chen *et al.*, 2008). La incidència mitjana de la LLC és d'aproximadament 3 casos per cada 100.000 habitants l'any (Oscier *et al.*, 2004). La malaltia es manifesta majoritàriament en individus de mitjana i avançada edat, sent l'edat mitja del diagnòstic 72 anys i l'edat mitja de mort per LLC 79 anys (Gribben, 2009). Gairebé el 70% dels malalts de LLC tenen més de 65 anys en el moment del diagnòstic; mentre que un 11 % són menors de 55 anys (Gribben, 2009). Afecta a dos homes per cada dona afectada, però es desconeixen els motius d'aquesta diferència (Catovsky *et al.*, 1989; Oscier *et al.*, 2004).

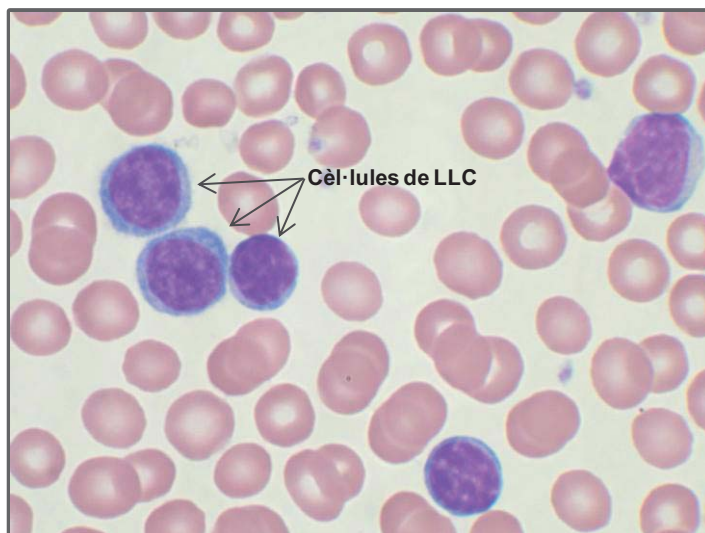


Figura I.18. Morfologia de les cèl·lules de LLC en sang perifèrica. En aquesta imatge i degut a la tinció, les cèl·lules de LLC són de color blau. La resta de cèl·lules que s'observen són eritròcits (http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Chronic_lymphocytic_leukemia.jpg).

3.2. SIGNES, SÍMPTOMES I COMPLICACIONS.

La LLC és una malaltia crònica, i els seus símptomes van apareixent gradualment. Durant les primeres fases de la malaltia, la qualitat de vida dels pacients es veu poc afectada, i només apareixen símptomes com la fatiga i la dificultat en la respiració durant l'exercici. En alguns casos, els pacients presenten una lleugera pèrdua de pes i un augment en la freqüència d'infeccions cutànies, respiratòries i urinàries. A mesura que augmenta la limfocitosi, els limfòcits B envaeixen el sistema limfàtic, els ganglis es fan grans (adenopatia) i s'afecten la melsa i el fetge (esplenomegàlia i hepatomegàlia). La invasió cel·lular de la medul·la òssia es dona en diferent grau segons el pacient, i té com a conseqüència la depleció de les altres poblacions hematopoètiques, com els eritròcits i les plaquetes. Els limfòcits B de la LLC són funcionalment inactius i desplacen a les poblacions immunològicament actives, de manera que el pacient presenta símptomes d'immunodeficiència que s'accentuen a mesura que la malaltia avança.

La LLC es presenta principalment en pacients de mitjana edat i ancians, amb una major freqüència en els decennis successius de la vida (Catovsky *et al.*, 1989). Hi ha pacients que desenvolupen una malaltia estable, que no es manifesta de manera greu durant anys, i els pacients poden sobreviure llargs períodes sense tractament. En canvi, hi ha pacients que desenvolupen una LLC progressiva, que es caracteritza per un temps de divisió ràpid dels limfòcits i pot ser fatal en un període curt de temps (Chiorazzi *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2008). En general, el temps de supervivència mig és de 8-12 anys a partir del diagnòstic (Rozman *et al.*, 1995). La majoria de complicacions de la LLC es deuen a les alteracions del sistema immune. La immunitat cel·lular i humoral està danyada i apareixen defectes quantitius i

qualitatius en cèl·lules B, T, *Natural Killers*, neutròfils i monòcits/macròfags. Entre les complicacions més freqüents es troben les infeccions, citopènies (anèmia i trombocitopènia) i la transformació de la malaltia a formes més agressives, com el limfoma difús de cèl·lules grans, la síndrome de Richter o la leucèmia prolimfocítica, associades al gen supressor de tumors p53 (Dearden, 2008).

3.3. ETIOLOGIA.

La etiologia de la LLC és desconeguda. A diferència d'altres tipus de leucèmia, la LLC no s'associa clarament a dosis altes de radiació, condicions ambientals determinades, agents químics o infeccions virals (Oscier *et al.*, 2004). En alguns casos es pot establir una història familiar directa entre casos de LLC i la relació és encara més clara quan es tenen en compte altres síndromes limfoproliferatius de tipus B associats a la LLC (limfomes i malaltia de Hodgkin, principalment). En aquests casos es reforça la idea de l'existència d'un component genètic i hereditari en el risc de patir LLC, i nombrosos estudis demostren que la LLC és la leucèmia en la que el component hereditari és més aparent (Yuille *et al.*, 2000; Houlston *et al.*, 2003; Sellick *et al.*, 2006). S'ha descrit que una disminució de l'expressió per metilació del gen de la proteïna DAPK1 que provoca una disminució en l'apoptosi de les cèl·lules de LLC, està associada a la LLC familiar (Raval *et al.*, 2007). Altres autors han fet estudis en altres pacients amb LLC familiar, però no s'ha trobat aquesta alteració en cap altre cas (Goldin *et al.*, 2007a; Goldin *et al.*, 2007b). Així doncs, s'haurà de seguir estudiant el rol de l'epigenètica en la LLC.

3.4. ORIGEN.

Es desconeix l'origen exacte de les cèl·lules de LLC, però les aproximacions immunobiològiques de la LLC i un millor coneixement del sistema immunològic normal han permès avançar en aquest camp (Chiorazzi *et al.*, 2005). Històricament es considerava que la LLC comprenia dos malalties diferents: una primera amb cèl·lules que expressaven gens IgVH no mutats (UM; *unmutated*) derivats de cèl·lules de *naïve* o immunoincompetents, que no havien passat pel centre germinal i que per tant no havien passat pel procés d'hipermutació somàtica de les immunoglobulines, i una segona amb cèl·lules mutades (M; *mutated*), que provenien de cèl·lules que havien tingut trobada amb l'antigen al centre germinal, i que per tant presentaven mutacions somàtiques en les cadenes de IgVH. Però actualment es coneix que totes les cèl·lules de LLC expressen a la seva superfície un fenotip de cèl·lula B que s'ha trobat (*antigen-experienced*) (CD27) i s'ha activat (CD23, CD25, CD69, CD71) amb l'antigen, i mostren expressió de gens similars a cèl·lules B de memòria, independentment de l'estat de mutació de les IgVH. Això demostra que tots els casos de LLC tenen un origen cel·lular i un mecanisme de transformació comú (Pleyer *et al.*, 2009).

Així doncs, actualment es considera que la LLC és una malaltia heterogènia, originada a partir de limfòcits que poden diferir pel que fa a activació, estat de maduresa i subgrup cel·lular. Són limfòcits B madurs estimulats per antigen, que expressen en la seva superfície els marcadors CD19, CD5, i CD23 i nivells reduïts de IgM, IgD, i CD79b. S'havia estimat que només un 2-5% de cèl·lules de LLC proliferaven, però un estudi recent ha demostrat que fins el 27% de cèl·lules proliferen (Chiorazzi, 2007). Als nòduls limfàtics, en unes àrees anomenades centres proliferatius, s'han trobat marcadors de proliferació cel·lular, i alguns autors creuen que aquestes àrees són les zones anatòmiques on es produeixen les cèl·lules de LLC, amb el suport d'altres tipus cel·lulars (Chiorazzi, 2007).

Estudis recents amb noves tècniques de citometria de flux, han permès identificar un subpoblació monoclonal de cèl·lules B, fenotípicament similar a la LLC, en un 3.5% de individus sans, anomenada limfocitosi B monoclonal (LBM) (Rawstron *et al.*, 2002). Les LBMs són més freqüents en homes i la seva freqüència augmenta amb l'edat. Té una incidència superior en familiars de pacients de LLC. Així, s'ha hipotetitzat que aquesta població podria ser l'origen de la LLC, tot i que degut a que la seva incidència és 100 vegades superior a la de la LLC, més aviat sembla que afavoriria l'aparició d'un clon leucèmic, però no seria el pas previ pel desenvolupament de la LLC (Revisat a Caligaris-Cappio *et al.*, 2008).

3.5. ALTERACIONS GENÈTIQUES.

Fins al moment, tot tipus de càncer sembla originar-se a partir d'alteracions o mutacions en l'ADN, de manera que l'expressió i la funcionalitat dels gens es veu alterada, desequilibrant la relació entre els processos de proliferació i mort (Green *et al.*, 2002). En el cas de la LLC, s'han observat una gran quantitat d'anomalies cromosòmiques. Les principals es recullen a la Taula I.4. Aproximadament el 82% dels pacients de LLC presenten algun tipus d'alteració cromosòmica (Dohner *et al.*, 2000).

ALTERACIÓ	INCIDÈNCIA (%)	EFFECTE
Deleció 13q14	50-60	Supressió dels microRNAs miR15a/miR-16
Deleció 11q22	10-20	Inactivació d'ATM
Trisomia 12	15-25	Protooncogen desconegut
Deleció 17p13	5-10	Inactivació de p53
Deleció 6q21	6-7	Inactivació d'un gen supressor de tumors desconegut
Alteracions 8q24	5	Sobreexpressió de MYC?
Translocació 18q21	1-4	Sobreexpressió de BCL-2
Silenciament genètic i epigenètic de DAPK1	80	Inactivació de DAPK1

Taula I.4. Alteracions genètiques més comuns en la LLC.

- **Delecions 13q14.**

És la més comú de les alteracions cromosòmiques. La majoria de casos (70%) són delecions monoal·lèliques i en un 30% són bial·lèliques (15%) o amb mosaïcisme mono/bial·lèliques (15%). Aquesta regió conté un clúster que conté els microRNA miR15a/miR-16, que regulen la transcripció del gen BCL-2 (Calin *et al.*, 2006). En la majoria de casos de LLC aquests microRNAs han estat eliminats o reprimits (Calin *et al.*, 2002).

- **Trisomia 12.**

Apareix en un 10-20% dels casos de LLC. S'hipotetitza que el cromosoma 12 té un possible oncogen encara no descrit, i s'han descrit possibles oncògens candidats en el braç 12q, com CDK4 (Byrd *et al.*, 2004; Seiler *et al.*, 2006).

- **Delecions 11q22-q23.**

En aquesta regió es localitza el gen que codifica per ATM (ataxia telangiectasia mutada). La proteïna ATM està involucrada en la fosforilació i estabilització de p53 en resposta al dany a l'ADN (Vogelstein *et al.*, 2000; Vousden *et al.*, 2002), i la seva inactivació proporciona una via alternativa per inhabilitar la funció de p53 en LLC (Pettitt *et al.*, 2001). En aquests casos, la via de p53 encara pot ser activada amb tractaments que sobrepassen la via d'ATM/p53 (Coll-Mulet *et al.*, 2006). També s'han descrit mutacions d'ATM en el al·lel no deleccionat i en casos familiars sense delecio (Bullrich *et al.*, 1999; Stankovic *et al.*, 1999). La regió 11q23 conté, a més, un altre clúster de microRNAs, miR-34b/miR-34c de funció desconeguda fins fa molt poc (Calin *et al.*, 2006). Recentment, s'ha identificat a miR-34 com part de la via de p53, que es transactiva per p53 i és capaç de promoure l'apoptosi (Chang *et al.*, 2007; He *et al.*, 2007).

- **Delecions 17p13.**

En aquesta regió es troba el gen supressor de tumors p53. És un gen supressor de tumors molt important que es troba alterat en molts tipus de tumors. En la LLC, un 5-10% de pacients tenen p53 mutat en el moment del diagnòstic, i augmenta fins un 30% en pacients amb quimioresistència (el Rouby *et al.*, 1993; Wattel *et al.*, 1994; Dohner *et al.*, 2000; Seiler *et al.*, 2006).

- **Delecions 6q21.**

S'ha detectat per FISH que un 5% dels pacients de LLC tenen aquesta alteració. La delecio 6q correlaciona amb una morfologia atípica, CD38 positiu i una incidència intermitja de mutacions somàtiques de IgV_H (Cuneo *et al.*, 2004). A més, s'associa a una acceleració de la

malaltia cap a leucèmia prolimfocítica, un estadi més agressiu de la LLC (Zhang *et al.*, 1997; Glassman *et al.*, 1998). No s'ha identificat cap gen supressor de tumors que pugui estar implicat en la patogènesi de la LLC (Merup *et al.*, 1998).

- **Amplificacions 8q24.**

S'han detectat amplificacions 8q24 en un 5% de pacients de LLC. *MYC* està localitzat en 8q24 i alteracions de *MYC* en LLC han estat descrites prèviament en LLC (Rimokh *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1991; Vallat *et al.*, 2003; Kienle *et al.*, 2005). També s'han associat una elevada expressió de *c-myc* amb resistència a l'apoptosi induïda per dany a l'ADN (Vallat *et al.*, 2003).

- **Reordenament del gen *BCL-2* (translocació 18q21).**

BCL-2 es va detectar sobreexpressat en limfoma fol·licular com a conseqüència de la translocació t(14; 18), que col·loca al gen de *BCL-2* sota el control dels potenciadors presents en el promotor de les cadenes pesades de les immunoglobulines (Tsujimoto *et al.*, 1984). En LLC aquesta translocació és poc freqüent (1-4%) i podria explicar la sobreexpressió de *BCL-2* en molts pocs casos, ja que aquesta sobreexpressió es dona en un 70% dels pacients. La deleció del clúster de microRNA miR15a/miR-16 (13q14) podria explicar en la majoria de casos la sobreexpressió de *BCL-2* (Calin *et al.*, 2006).

- **Altres alteracions.**

Moshynska i col·laboradors van descriure una alteració en el promotor de *MCL-1* en el 30% de les mostres de LLC, convertint-la en l'alteració més freqüent en LLC (Moshynska *et al.*, 2004). Diversos treballs, entre ells un del nostre grup (Coenen *et al.*, 2005; Iglesias-Serret *et al.*, 2005; Tobin *et al.*, 2005), van concloure que contràriament al descrit per Moshynska i col·laboradors, aquestes alteracions representen polimorfismes hereditaris que no predisposen a la LLC.

Recentment, s'ha identificat a *DAPK1* (*Death-associated protein kinase 1*) com un gen silenciats en la LLC (Raval *et al.*, 2007). Segons aquest estudi, la silenciació epigenètica de *DAPK1* per metilació del promotor es dona en pràcticament tots els pacients de LLC. A més, en un cas de leucèmia familiar s'ha identificat una mutació/polimorfisme en el promotor de *DAPK1* que causa la repressió de l'expressió de *DAPK1* degut a un increment de la unió al repressor transcripcional HOXB7. *DAPK1* és un modulador proapoptòtic que ha estat descrit com diana de p53 i activador d'apoptosi a través de la via ARF/p53 (Martoriati *et al.*, 2005). El fet que l'expressió de *DAPK1* estigui reprimida en tumors suporta el concepte general de l'evasió dels programes de mort com característica de les cèl·lules de LLC.

3.6. DIAGNÒSTIC.

La LLC s'acostuma a detectar en revisions mèdiques rutinàries o en resposta a un lleuger malestar dels pacients, com ara cansament i problemes respiratoris durant l'exercici. El principal criteri en el diagnòstic de la malaltia és la detecció d'un augment permanent en la limfocitosi absoluta en sang perifèrica ($>5 \times 10^9/L$), acompanyada d'infiltració limfocitària ($>30\%$) al moll d'os. Es tracta de limfòcits aparentment madurs, petits i amb la cromatina nuclear condensada, on el nucli ocupa la major part del volum cel·lular. Són cèl·lules fràgils, que es trenquen fàcilment durant l'extensió de frotis, adquirint al microscopi aspecte de taca (ombres de Gumprecht).

La determinació de l'immunofenotip permet el diagnòstic i evita la confusió amb altres tipus cel·lulars. Els limfòcits de LLC coexpressen els antígens CD5, CD19, CD20 i CD23 (Jennings *et al.*, 1997). A més, expressen concentracions baixes d'immunoglobulina de superfície, majoritàriament IgM i IgD, en comparació a cèl·lules B normals de sang perifèrica, i una sola cadena lleugera (kappa o lambda) (Rozman *et al.*, 1995).

3.7. PRONÒSTIC.

L'evolució clínica dels pacients amb LLC és extremadament heterogènia, amb alguns casos indolents i altres d'evolució molt agressiva. Amb l'objectiu de predir un pronòstic pels casos individuals i d'identificar els pacients amb millor i pitjor pronòstic, s'ha establert un llistat de criteris clínics i diagnòstics.

- ESTADIS CLÍNICS

Entre els procediments estàndards per estimar el pronòstic de la LLC s'inclou el sistema de classificació en estadis clínics desenvolupat per Rai (Rai *et al.*, 1975) i Binet (Binet *et al.*, 1981). Per assignar un estadi clínic a un pacient només cal realitzar una exploració física i un comptatge de leucòcits. Actualment, els tres sistemes més utilitzats en la classificació de la LLC en estadis són encara el sistema de Rai, el sistema de Binet i el sistema classificatori adoptat en el *International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia*, que és una combinació dels dos anteriors.

Malauradament, aquest sistema de classificació té limitacions: no permet predir (a) la velocitat de progressió de la malaltia en pacients diagnosticats en una etapa primerenca de la malaltia, ja que hi ha heterogenicitat en l'evolució entre els individus en un mateix estadi; (b) la probabilitat de resposta al tractament en una etapa avançada o (c) si hi haurà progressió (i com serà) en pacients diagnosticats en etapes primerenques. Molts pacients són diagnosticats en estadis preliminars de la malaltia (80%).

CLASSIFICACIÓ DE RAI			
ESTADI	CARACTERÍSTIQUES		SUPERVIVÈNCIA MITJA
0	Limfocitosi absoluta sense adenopatia, hepatoesplenomegàlia, anèmia o trombocitopènia.		> 15 anys
I	Limfocitosi absoluta amb adenopatia.		~ 7 anys
II	Limfocitosi absoluta amb esplenomegàlia i/o hepatomegàlia.		~ 5 anys
III	Limfocitosi absoluta amb anèmia i/o esplenomegàlia o hepatomegàlia.		~ 2 anys
IV	Limfocitosi absoluta amb trombocitopenia.		~ 2 anys

CLASSIFICACIÓ DE BINET			
ESTADI	CARACTERÍSTIQUES	AL AFECTADES	SUPERVIVÈNCIA MITJA
A	Sense anèmia ni trombocitopènia (Rai: 0, I i II)	< 3 àrees	> 10 anys
B	Sense anèmia ni trombocitopènia (Rai: I i II)	3 o més àrees	~ 5 anys
C	Anèmia i/o trombocitopènia (Rai: III i IV)	Independent	~ 2 anys

Taula I.5. Classificació de la LLC per estadis clínics. La limfocitosi es considera absoluta quan el recompte limfocitari és permanent i superior a $15 \times 10^9/L$; l'anèmia, quan l'hemoglobina plasmàtica és inferior a 11 g/dL; i trombocitopènia quan el recompte de plaquetes és inferior a $100 \times 10^9/L$. AL són les àrees limfàtiques, que inclouen els ganglis de les cervicals, axil·les i ingonals, fetge i melsa.

- CRITERIS BIOLÒGICS

Entre els marcadors biològics de pronòstic s'inclouen:

1. Característiques clíniques com l'edat, el sexe i l'estat funcional.
2. Paràmetres de laboratori que reflecteixin la càrrega tumoral o l'activitat de la malaltia, com el recompte de limfòcits, l'elevació de la lactat deshidrogenasa (LDH), el perfil d'infiltració en medul·la òssia o el temps de doblatge de limfòcits (LDT, *lymphocyte doubling time*).
3. Marcadors sèrics com CD23 soluble (una molècula de superfície de les cèl·lules de LLC. Nivells elevats d'aquesta forma soluble es relacionen amb progressió de la malaltia, patró difús d'infiltració de medul·la òssia, un LDT curt i nivells elevats de timidina quinasa); la $\beta 2$ -microglubulina ($\beta 2$ -MG; una proteïna extracel·lular que s'expressa en cèl·lules nucleades, i que s'associa al complex major d'histocompatibilitat de classe I) o la timidina-quinasa (TK; un enzim implicat en la síntesi d'ADN).

- CRITERIS GENÈTICS.

L'avanç més important en la determinació del pronòstic de la LLC és la determinació del estadi mutacional de les IgV_H . L'anàlisi de les Ig va mostrar que hi havia dos subclasses, diferenciades segons la incidència de mutacions somàtiques en els gens V de les Ig (Schroeder *et al.*, 1994),

i al 1999, dues publicacions simultànies van demostrar la significació del estat mutacional M (*mutated*) o UM (*ummutated*), en el pronòstic dels malalts de LLC (Damle *et al.*, 1999; Hamblin *et al.*, 1999). Pels pacients en estadi A de Binet, la supervivència dels casos UM és entre 8 i 10 anys de mitjana, mentre que en els casos M presenten una progressió més lenta de la malaltia, i la seva supervivència s'allarga fins els 25 anys (Figura I.19). Aquests estudis també mostren la relació entre els casos UM i la necessitat de quimioteràpia, resistència al tractament i presència d'alteracions citogenètiques marcadores de pitjor pronòstic.

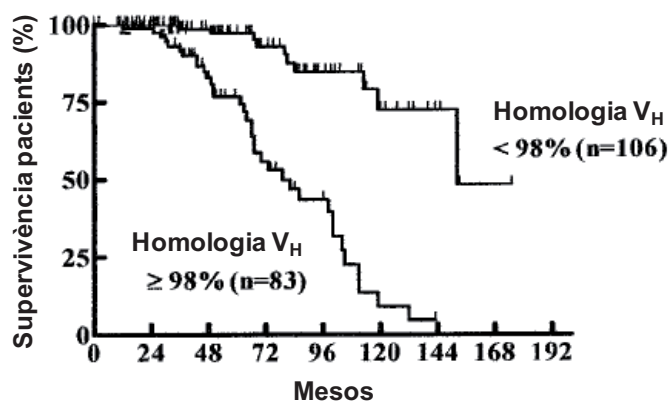


Figura I.19. Probabilitat de supervivència des de la data del diagnòstic de pacients UM (VH homologia <98%) o M (VH homologia >98%) (Modificat de Stevenson *et al.*, 2004).

Actualment, la determinació de l'estat mutacional de les IgV_H és car i tècnicament difícil, i per tant no es pot aplicar de manera rutinària en clínica. Per això, s'han intentat trobar marcadors genètics de determinació fàcil als laboratoris hematològics que correlacionin amb l'estat mutacional de les immunoglobulines (Figura I.20). Inicialment es va observar una correlació entre l'estat de mutació de V_H i l'expressió del marcador de membrana CD38 (revisat en (Seiler *et al.*, 2006). Posteriorment, basant-se en estudis d'expressió del genoma es va identificar i validar l'expressió de ZAP-70 (*zeta-associated protein 70*), una tirosina quinasa implicada en la senyalització del TCR en limfòcits T, com un marcador substitut (Crespo *et al.*, 2003).

Malauradament, els treballs realitzats amb CD38 i ZAP-70 han donat lloc a resultats controvertits: (1) s'han obtingut resultats divergents en diferents laboratoris, (2) els nivells d'expressió poden canviar amb el temps (CD38), (3) és necessària una separació curosa del limfòcits T, ja que aquests expressen constitutivament ZAP-70, (4) s'han establert diferents valors de tall per diferenciar valors positius i negatius (CD38 i ZAP-70), i (5) aproximadament de un 10% a un 30% dels casos presenten discordances al comparar amb l'estat de mutació de V_H (revisat en (Seiler *et al.*, 2006). L'ús d'aquests marcadors és útil quan no hi ha cap altre material disponible o no es poden realitzar altres tècniques (Carreras *et al.*, 2005).

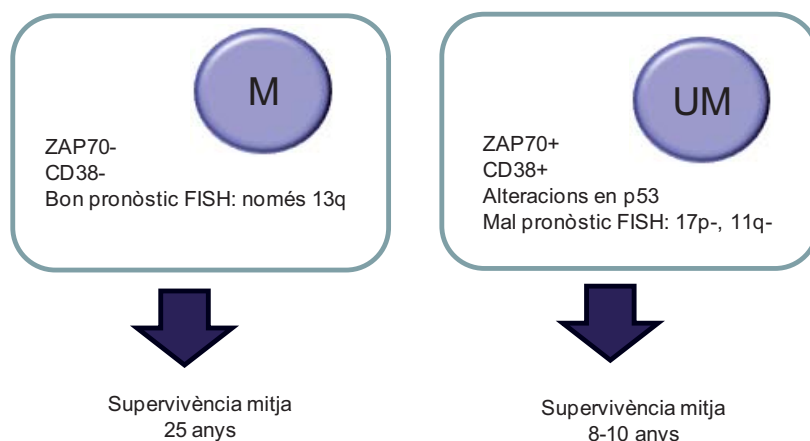


Figura I.20. Principals diferències entre los casos de M y UM. (Revisat a Seiler *et al.*, 2006).

Un altre paràmetre molt utilitzat en el pronòstic de la LLC són les alteracions cromosòmiques. Els pacients amb cariotip normal o deleció en 13q són els que tenen millor pronòstic de supervivència (Stilgenbauer *et al.*, 2002). Les delecions 13q14 es presenten en un 50% de pacients i corresponen a millor pronòstic. Sembla que les delecions bial·lèliques tenen un component més agressiu (Dewald *et al.*, 2003). La supervivència mitjana és de 133 mesos (Reddy, 2006). La trisomia 12 està relacionada amb una morfologia i un immunofenotip atípic, amb una taxa elevada de proliferació i amb estadis clínics avançats. La supervivència associada intermitja és de 114 mesos. Les delecions 11q22-23 s'associen a pacients joves, una ràpida progressió de la malaltia, estadis clínics avançats i una marcada limfadenopatia i mala supervivència (79 mesos) (Schaffner *et al.*, 1999; Dohner *et al.*, 2000; Reddy, 2006). L'alteració de p53 s'associa a resistència a la quimioteràpia i a la transformació de la LLC en limfoma difús de cèl·lules grans o síndrome de Richter (Fenaux *et al.*, 1992; Newcomb, 1995; Bea *et al.*, 2002). Les delecions de 17p i/o anormalitats en el gen *TP53* han estat associades a resistències a la teràpia amb agents alquilants, anàlegs de purines i rituximab (el Rouby *et al.*, 1993; Dohner *et al.*, 2000). La supervivència en aquests casos és curta (32 mesos) (Figura I.21).

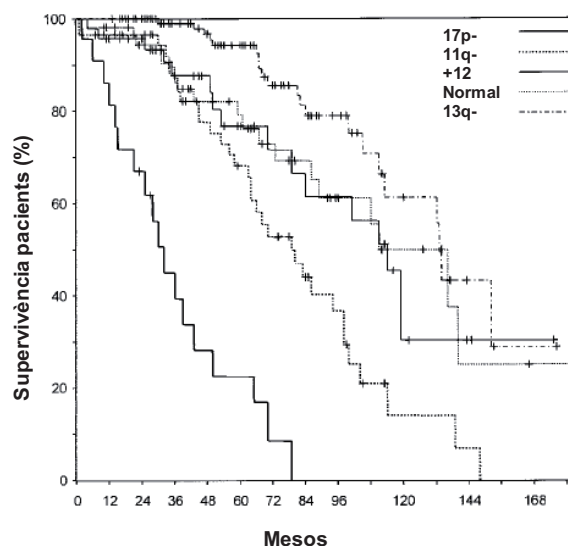


Figura I.21. Rellevància de les aberracions genòmiques de LLC. Probabilitat de supervivència desde la data del diagnòstic de pacients amb les alteracions cromosòmiques més freqüents en LLC. Modificat de Dohner *et al.*, 2000.

3.8. IMPACTE DEL MICROENTORN CEL·LULAR.

Les cèl·lules de LLC tenen un vida mitja llarga *in vivo* i són resistents a l'apoptosi, però al posar-les en cultiu entren en apoptosi, probablement per falta de factors de l'entorn cel·lular que indueixen la seva supervivència *in vivo*. Existeixen una gran varietat de factors de supervivència implicats en la prevenció de l'apoptosi de les cèl·lules de LLC, i s'han identificat varies vies de senyalització per citokines aberrants. Entre elles, la IL-4 (Interleuquina-4), l'IFN- γ (Interferó- α), l'IFN- α , la IL-2, la IL-6, la IL-8, la IL-13, el TNF- α (Factor de necrosis tumoral- α , *tumor necrosis factor*) i el SDF-1 α (*stromal cell derived factor-1 α*) (Jurlander, 1998). Així, les interaccions amb altres tipus cel·lulars o amb factors solubles presents en el microentorn cel·lular són molt importants en la patogènesi de la LLC.

Els pacients de LLC són immunoincompetents, i a més dels defectes ja descrits en les cèl·lules B, s'han descrit defectes en les cèl·lules T, les cèl·lules *Natural Killer* i les cèl·lules dendrítiques. Els limfòcits T citotòxics (LTC) modulen la supervivència de les cèl·lules de LLC a través del sistema CD40/CD40L. Els LTC produeixen CD40L, i l'activació de CD40 en les cèl·lules de LLC indueix proliferació i rescata les cèl·lules de l'apoptosi espontània i de l'induïda per la quimioteràpia. A més, l'activació del CD40 indueix la secreció de la IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF α , INF α , INF γ , i GMCF (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*), afavorint la supervivència de les LLC (Stevenson *et al.*, 2004; Pleyer *et al.*, 2009).

A més dels limfòcits T activats que se suposa que ofereixen un suport proliferatiu a curt plaç, hi ha altres tipus cel·lulars accessoris que es poden trobar en el microambient de les cèl·lules de LLC. Aquestes cèl·lules accessoris estan en contacte amb les cèl·lules leucèmiques i ofereixen suport proliferatiu a llarg plaç i beneficis en la supervivència. *In vitro*, les cèl·lules del estroma donen suport a la supervivència de les cèl·lules de LLC gràcies a l'adhesió a l'estroma mitjançada per integrines, i a la secreció de factors solubles, com les quemoquinas. Les cèl·lules dendrítiques fol·liculars expressen VCAM-1 i ICAM-1, que s'uneixen a VLA-4 i LFA-1. A més, secreten CXCL13, que indueix la localització dels limfòcits B en els fol·licles dels teixits limfoides secundaris. Les cèl·lules de l'estroma de la medul·la òssia (*bone marrow cells*) i les cèl·lules de l'estroma extramedul·lar d'origen mesenquimal secreten grans quantitats de SDF1 α (CXCL12) (Pleyer *et al.*, 2009) (Figura I.22).

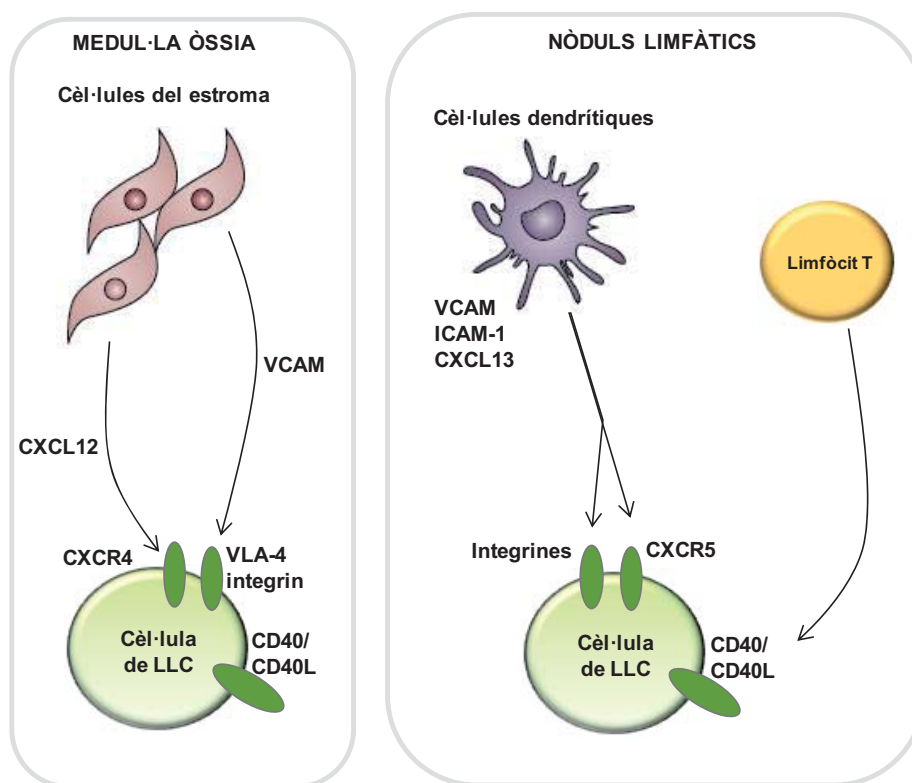


Figura I.22. Interaccions cel·lulars de les cèl·lules de LLC amb el microentorn.

3.9. VIES DE SUPERVIVÈNCIA I RESISTÈNCIA A L' APOPTOSI.

Tots aquests factors del microentorn cel·lular actuen provocant canvis en les proteïnes que constitueixen la xarxa de transducció de senyals que regula la supervivència i l'apoptosi de les cèl·lules de LLC. Aquests canvis afecten finalment als nivells o les funcions de les proteïnes que regulen l'apoptosi. A continuació es resumeixen les vies de transducció de senyals implicades en la supervivència i apoptosi de les cèl·lules de LLC.

3.9.1. LA VIA DE PKC.

La primera evidència de la implicació de PKC en la supervivència de les cèl·lules de LLC va ser l'observació que els èsters de forbol (PMA) disminuïen la sensibilitat a la colquicina (O'Connor, 1985). Prèviament s'havia publicat que l'activació de les PKC amb PMA induïa la diferenciació de les cèl·lules de LLC (Totterman *et al.*, 1980). Més tard, es va descriure que la incubació de les cèl·lules de LLC amb PMA disminuïa l'apoptosi espontània (Forbes *et al.*, 1992) i la induïda per la quimioteràpia *in vitro* (Barragan *et al.*, 2002). Resultats similars han estat publicats per un altre activador de PKC, la briostatina (Kitada *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 2004). A més, inhibidors generals de PKC, com el Bis I o PKC412 indueixen apoptosi en aquestes cèl·lules (Kitada *et al.*, 1999; Barragan *et al.*, 2002). Aquests resultats concorden amb el fet que les LLC tenen activada PKC basalment (Barragan *et al.*, 2002) indicant que hi ha sempre una activitat basal d'aquesta via i que és fonamental per la supervivència cel·lular (Barragan *et al.*, 2003).

Recentment, s'ha estudiat l'expressió de les isoformes de PKC en pacients de LLC. En tots els pacients analitzats s'expressen les isoformes β , γ , δ , ζ . L'expressió de la resta d'isoformes és variable segons el pacient analitzat (α , ϵ , λ), i no s'ha trobat expressió de les isoformes μ i θ (Alkan *et al.*, 2005; tesi doctoral M.Barragán). Aquest patró d'expressió és diferent al de les cèl·lules B normals, que expressen més PKC α , PKC β I i menys PKC ϵ que les cèl·lules de LLC (Abrams *et al.*, 2007). Abrams i col·laboradors, a més, han quantificat cada isoforma i han vist que la isoforma PKC β II és la que s'expressa majoritàriament en les cèl·lules de LLC, i és molt més activa que en cèl·lules B normals. Així doncs, PKC β II està sobreexpressada en LLC (Li *et al.*, 2007). Es desconeix si la variabilitat en l'expressió de les isoformes s'associa amb altres marcadors d'expressió heterogènia en les cèl·lules de LLC, com ZAP70, CD38, o l'estat mutacional de les immunoglobulines, tot i que Abrams i col·laboradors han observat més expressió de la isoforma PKC β II en els estadis més avançats de la malaltia (Estadi C) i en mostres amb mutacions 11q i 17p, i la seva activitat correlaciona amb la resposta de les cèl·lules de LLC a la unió del BCR de manera inversa: la unió de BCR indueix un augment de supervivència acompanyat d'un augment dels nivells de MCL-1 en aquells pacients amb nivells baixos de PKC β II (Abrams *et al.*, 2007). Aquest mateixos autors, també han descrit que la inhibició de PKC β amb l'inhibidor selectiu LY379196 no indueix apoptosi en les cèl·lules de LLC.

Hi ha altres estudis que relacionen altres isoformes de PKC amb LLC. S'ha descrit que PKC δ es troba constitutivament activa en les cèl·lules de LLC, de manera dependent de PI3K, i la seva inhibició de manera inespecífica, amb rottlerin, indueix apoptosi en cèl·lules de LLC però no en cèl·lules B normals (Ringshausen *et al.*, 2002; Ringshausen *et al.*, 2006). Cal tenir present que la rottlerin no és específica, i inhibeix altres isoformes de PKC i altres proteïnes a la mateixa concentració que s'utilitza per inhibir PKC δ . Recentment, s'ha descrit que l'activitat de PKC δ és crucial en el manteniment de la supervivència cel·lular induït per l'activació de Syk (Baudot *et al.*, 2009). Aquests autors han demostrat que el siRNA de PKC δ disminueix la viabilitat cel·lular, l'expressió de MCL-1, i la fosforilació de Akt en Ser473 i de GSK3. Es desconeix com Syk regula PKC δ i com PKC δ regula Akt.

Altres estudis senyalen que la inhibició selectiva de PKC α en cèl·lules progenitores hematopoètiques de ratolí provoca el desenvolupament espontani d'una població similar a les cèl·lules de LLC (Nakagawa *et al.*, 2006).

Gràcies a l'aparició d'inhibidors selectius hem pogut estudiar el paper de les PKC en les cèl·lules de LLC. En aquesta tesi hem utilitzat: Bisindolilmaleimida (Bis I), un inhibidor de PKC clàssiques i noves (Way *et al.*, 2000), i LY333531, un inhibidor selectiu de PKC β (Jirousek *et al.*, 1996).

3.9.2. LA VIA DE PI3K/AKT.

Ja fa anys que es coneix que la via de PI3K/Akt està activada en les cèl·lules de LLC, i que juga un paper important en la supervivència d'aquestes cèl·lules. Les cèl·lules de LLC presenten activitat PI3K de manera basal (Barragan *et al.*, 2002; Barragan *et al.*, 2003), i s'ha descrit que té un paper molt important en la supervivència de les cèl·lules de LLC induïda per albúmina (Wickremasinghe *et al.*, 2001), plasma autòleg (Wickremasinghe *et al.*, 2001; Barragan *et al.*, 2002), IL-4 (Dancescu *et al.*, 1992; Barragan *et al.*, 2002), àcid lisofosfatídic (Hu *et al.*, 2005), i SDF-1 α (Nishio *et al.*, 2005).

La via de PI3K/Akt ha estat implicada en la resposta a l'activació del receptor de cèl·lules B (BCR) (Petlickovski *et al.*, 2005). L'activació sostinguda del BCR indueix l'activació de PI3K que correlaciona amb una reducció en l'apoptosi espontània i en la induïda per la quimioteràpia (Bernal *et al.*, 2001; Petlickovski *et al.*, 2005).

A més, la inhibició de PI3K amb LY294002 o wortmanina indueix apoptosi en aquestes cèl·lules (Barragan *et al.*, 2002; Ringshausen *et al.*, 2002), i augmenta la sensibilitat de les cèl·lules de LLC a l'apoptosi induïda pel tractament *ex vivo* amb fludarabina, dexametasona i clorambucil (Barragan *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2003)

La diana més important de PI3K, Akt, també ha estat implicada en la supervivència de les cèl·lules de LLC. Així, les cèl·lules de LLC presenten Akt fosforilada de manera basal (Cuni *et al.*, 2004; Petlickovski *et al.*, 2005; Ticchioni *et al.*, 2007; Zhuang *et al.*, 2009) i el tractament de

les cèl·lules de LLC amb diferents citocines (com CXCL12, CCL21, CCL19 and CXCL13) indueix un augment de la viabilitat cel·lular, junt amb un augment en la fosforilació d'Akt, i de les seves dianes GSK3 i FoxO3a. Aquest augment de viabilitat és bloquejat per l'ARN d'interferència de FoxO3, que també bloqueja l'apoptosi espontània (Ticchioni *et al.*, 2007).

La introducció de la forma constitutivament activa d'Akt, augmenta la viabilitat de les cèl·lules de LLC (Longo *et al.*, 2008), i indueix un augment concomitant en els nivells de la proteïna antiapoptòtica MCL-1. La inhibició de MCL-1 pel tractament amb siRNA indueix apoptosi en les cèl·lules de LLC (Longo *et al.*, 2008). Aquests autors suggereixen que l'augment de viabilitat per Akt és mitjançat per MCL-1, però el mecanisme de regulació de MCL-1 per Akt és desconegut.

Altres autors han vist que el grau d'activació d'Akt correlaciona amb els pacients amb un estat més avançat de la malaltia, on les cèl·lules són capaces de proliferar més fàcilment en rebre determinats estímuls, com CpG-oligodeoxinucleòtids (Longo *et al.*, 2007).

S'ha estudiat la presència de la mutació E17K d'Akt en cèl·lules de LLC. Dels 116 pacients estudiats, en cap es va trobar aquesta mutació (Mahmoud *et al.*, 2008; Zenz *et al.*, 2008). Així, es confirma que la hiperactivitat d'Akt no és deguda a mutació.

Pel que fa a PTEN, a la bibliografia només hi ha un treball on s'estudia la seva expressió en cèl·lules de LLC. Leupin i col·laboradors descriuen que en el 28% de pacients estudiats no es va detectar expressió de la proteïna PTEN, i en un 20% es va detectar una baixa expressió. Malauradament, en aquest estudi no es va estudiar l'activitat PI3K/Akt, de manera que no podem saber si aquests pacients amb poca o nul·la expressió de PTEN tenien una altra activitat PI3K (Leupin *et al.*, 2003). Molt recentment, s'ha descrit que les cèl·lules de LLC tenen nivells alts de PTEN fosforilat (i per tant inactivat) respecte les cèl·lules B normals (Martins *et al.*, 2009).

Un altre mecanisme que s'ha proposat per explicar l'augment de l'activitat d'Akt és la seva unió amb TCL-1. Aquesta unió fa que augmenti molt l'activitat d'Akt (Laine *et al.*, 2000; Pekarsky *et al.*, 2000). Fa uns anys es va descriure que els ratolins transgènics pel gen humà *TCL1* sota el control d'un promotor de gens de les immunoglobulines de teixit (E μ -TCL1) desenvolupaven expansions oligoclonals de cèl·lules B que evolucionaven a leucèmies B monoclonals (Bichi *et al.*, 2002), en alguns casos molt similars a la LLC. En les cèl·lules de pacients de LLC, s'ha trobat una expressió de TCL-1 variable, però detectable en el 90% de casos, i els nivells d'expressió correlacionen amb una LLC més agressiva i de pitjor pronòstic (Herling *et al.*, 2006; Herling *et al.*, 2009).

3.9.3. LA VIA DE NFκB.

La IKK activa el factor de transcripció NFκB per fosforilació del seu inhibidor IκBα (Karin *et al.*, 2002). Les cèl·lules de LLC tenen nivells alts d'activitat NFκB, que disminueixen al cultivar les cèl·lules de LLC *in vitro* (Furman *et al.*, 2000; Cuni *et al.*, 2004). En canvi, l'activitat de IKK no està augmentada en els limfòcits de la LLC si comparem amb els limfòcits B normals (Munzert *et al.*, 2002). L'activació del receptor de CD40 i la seva combinació amb l'activació del BCR augmenta l'activitat de NFκB i perllonga la supervivència *ex vivo* de les cèl·lules de LLC (Bernal *et al.*, 2001). NFκB augmenta l'expressió de proteïnes antiapoptòtiques com BCL-X_L, XIAP y FLIP (Karin *et al.*, 2002). L'activació de NFκB podria explicar l'efecte del lligand de CD40 (CD40L) en l'expressió de BCL-X_L i FLIP en les cèl·lules de LLC (Kitada *et al.*, 1999).

3.9.4. LA VIA DE P53/ATM.

La via de p53 està alterada en un percentatge important dels casos de LLC. Les anomalies de p53 s'associen a un estat avançat de la malaltia, l'excés de prolimfòcits i una major incidència de transformació a síndrome de Richter, i a una baixa resposta al tractament amb anàlegs de purina i agents alquilants. De fet, les alteracions en p53 estan entre els indicadors amb pitjor pronòstic en la LLC (Dohner *et al.*, 2000). *TP53* està mutat només en un 5-10% dels casos de LLC en el moment del diagnòstic, però aquest percentatge augmenta fins el 30% en els casos de tumors que han adquirit resistència a la quimioteràpia (Seiler *et al.*, 2006). Aquesta incidència és baixa si es compara amb altres neoplàsies (<http://www.p53.iarc.fr>).

Un dels principals mecanismes implicats en l'estabilització de p53 en resposta al dany a l'ADN és la seva fosforilació per la proteïna ATM (Vogelstein *et al.*, 2000; Vousden *et al.*, 2002). La proteïna ATM és una quinasa que actua en varies vies bioquímiques que connecten el dany a l'ADN amb els processos cel·lulars de regulació del cicle cel·lular, reparació de l'ADN i apoptosi. ATM fosforila i activa p53 (Vousden *et al.*, 2002). La inactivació total o parcial de la expressió d'ATM s'ha observat en 20-40% de pacients de LLC, i s'han trobat mutacions en *ATM* en un 10-30% dels casos de LLC (Stankovic *et al.*, 1999; Austen *et al.*, 2005), que correlacionen amb un pitjor pronòstic de la malaltia. De fet, fins fa poc, ATM era la única proteïna quinasa que s'havia trobat mutada en la LLC però recentment s'ha descrit també la mutació de *DAPK1* en la LLC (Raval *et al.*, 2007). Així, en pacients amb nivells baixos d'ATM, p53 pot no estar suficientment activat per la inducció d'apoptosi en resposta a agents que puguin danyar l'ADN (Pettitt *et al.*, 2001), el que suposa una via alternativa per incapacitar la funció de p53. D'altra banda s'han descrit sobreexpressions de MDM2, tot i que l'impacte d'aquesta sobreexpressió en la disfunció de p53 és controvertit, i s'ha suggerit que els nivells basals de MDM2 no afecten a l'activació de p53 en les cèl·lules de LLC (Pettitt *et al.*, 2001).

D'aquesta manera, alteracions en la via de p53 porten a la cèl·lula a una major resistència a l'apoptosi i a la inhibició de la parada de cicle induïda per molts quimioterapèutics que utilitzen aquestes vies.

3.9.5. LES VIES APOPTÒTIQUES I LA FAMÍLIA DE BCL-2.

Moltes senyals convergeixen en les cèl·lules de LLC, i en determinen la supervivència i l'apoptosi. Un gran nombre de components de vies proapoptòtiques ha estat caracteritzat en les cèl·lules de LLC. Sabem que les LLC expressen CD95, però són molt resistents a l'apoptosi induïda per la unió del seu lligand CD95L (Tinhofer, 1998). La sobreexpressió del regulador de CD95, TOSO, podria contribuir a aquesta resistència (Proto-Siqueira, 2008). Les cèl·lules de LLC també són resistents a la unió de TRAIL (Inoue, 2004), tot i que estudis recents mostren que el tractament de les cèl·lules de LLC amb inhibidors de histones desacetilases poden sensibilitzar a la mort per TRAIL (Inoue, 2004; McFarlane 2005).

Els membres de la família de BCL-2 són reguladors crítics de l'apoptosi en la LLC, i inclús la desregulació en els seus nivells d'expressió han estat relacionats amb l'alta supervivència de les cèl·lules de LLC *in vivo* (Longo *et al.*, 2008). En les cèl·lules de LLC es troben nivells alts de BCL-2 (Mariano *et al.*, 1992; Hanada *et al.*, 1993; Kitada *et al.*, 1998), i s'expressen altres membres de la família de BCL-2, com MCL-1, BCL-X_L, BCL-W_L i BFL-1, que han estat implicats en la supervivència d'aquestes cèl·lules (Kitada *et al.*, 1998; Bellosillo *et al.*, 1999; Kitada *et al.*, 1999; Kater *et al.*, 2004; Morales *et al.*, 2005). Nivells alts de MCL-1 i una ràtio augmentada de BCL-2 respecte BAX s'han associat a pitjor resposta al tractament (Kitada *et al.*, 1998; Bannerji *et al.*, 2003; Saxena *et al.*, 2004), i la inhibició de MCL-1 amb ARN d'interferència indueix apoptosi en les cèl·lules de LLC (Longo *et al.*, 2008).

L'activació de les proteïnes multidomini proapoptòtiques BAX i BAK facilita la sortida del citocrom *c* del mitocondri i l'activació de les caspases a través de la via mitocondrial d'apoptosi (Bellosillo *et al.*, 2002). Però la majoria d'estímuls apoptòtics no alteren els nivells proteics de BAX i BAK en les cèl·lules de LLC. Pel que fa als membres BH3-*only*, s'ha descrit que PUMA és una diana transcripcional de p53 quan aquesta és activada en les cèl·lules de LLC per radiació o drogues, com la fludarabina o els inhibidors de MDM2 (que també augmenten la transcripció de BAX) (Mackus *et al.*, 2005; Coll-Mulet *et al.*, 2006). Les cèl·lules de LLC també expressen les proteïnes BID, BMF, NOXA i BIM, però la regulació d'aquestes proteïnes ha estat poc estudiada en cèl·lules de LLC (Kater *et al.*, 2004; Morales *et al.*, 2004; Mackus *et al.*, 2005; Coll-Mulet *et al.*, 2006). Sí que es coneix que BIM s'indueix en resposta al tractament amb glucocorticoides (Iglesias-Serret *et al.*, 2007).

A més, l'inhibidor de les caspases XIAP s'expressa en nivells alts en les cèl·lules de LLC, i augmenta amb l'estimulació amb senyals de supervivència, indicant que també podria estar contribuint a la resistència a l'apoptosi a través de la inhibició de les caspases (Kitada *et al.*, 1999; Bannerji *et al.*, 2003; Longo *et al.*, 2008).

3.10. MODELS MURINS (EVALUACIÓ D'ESTRATÈGIES TERAPÈUTIQUES EN MODELS DE LLC).

Com hem vist en aquesta introducció, les cèl·lules de LLC semblen tenir defectes per entrar en apoptosi *in vivo*, mentre que quan es cultiven *ex vivo*, poden entrar en apoptosi, fet que suggereix que la supervivència de les cèl·lules de LLC depèn de senyals del microentorn cel·lular. Una aproximació per aconseguir entendre millor l'aparició de la malaltia i el seu desenvolupament són els models murins.

Fa uns anys van sorgir els primers models animals per la LLC. El 2002 es van descriure que els ratolins transgènics pel gen humà *TCL1* sota el control d'un promotor de gens de les immunoglobulines de teixit (E μ -*TCL1*), desenvolupaven expansions oligoclonals de cèl·lules B que evolucionaven a leucèmies B monoclonals (Bichi *et al.*, 2002). Cap als 2 mesos d'edat, aquests ratolins desenvolupaven poblacions de cèl·lules CD5+ al peritoneu, que s'evidenciaven més tard a melsa, sang perifèrica i a medul·la òssia (13-18 mesos). Alguns ratolins desenvolupaven una malaltia molt similar a la LLC. Tot i que l'expressió de *TCL1* es detecta en la majoria de pacients de LLC, la desregulació d'aquest gen no és exclusiva d'aquesta malaltia i sembla que s'ha d'acompanyar de la sobreexpressió d'altres factors perquè els animals desenvolupin LLC (Kipps, 2003). El tractament *in vivo* dels ratolins amb leucèmia amb fludarabina va demostrar que existia una reducció dels limfòcits en sang i melsa i que el tractament allargava la supervivència dels ratolins, de manera similar als humans. Inclús es va observar que apareixien resistències al tractament *in vivo* (Johnson *et al.*, 2006).

Un segon model es va descriure el 2004, on la sobreexpressió conjunta de *TRAF2DN* i *BCL-2* en ratolins provoca el desenvolupament d'esplenomegàlia, limfadenopaties i un augment de la població CD5+ similars a la LLC (Zapata *et al.*, 2004). A més, les cèl·lules B d'aquests ratolins no entren en apoptosi després del tractament amb dexametasona i fludarabina, indicant que poden ser un bon model per assajar noves teràpies per pacients quimioresistents (Machie *et al.*, 2007).

El desenvolupament d'aquests models obre les portes a la seva utilització en el disseny i avaluació de nous tractaments per la LLC.

3.11. TRACTAMENT.

A dia d'avui, cap règim de quimioteràpia ha aconseguit curar la LLC (Wierda *et al.*, 2006). Així, la LLC és una malaltia incurable que es dona en poblacions d'edat avançada i en molts casos progressa lentament, pel que sol ser tractada de manera conservadora, de manera que els pacients no comencen una teràpia immediatament després del diagnòstic, sinó que s'espera a que la malaltia progressi. En la majoria de casos es manté al pacient en observació durant llargs períodes de temps per controlar el curs normal de la malaltia, analitzant el temps de duplicació dels limfòcits. Sembla que aquest mètode de "observar i esperar" podria superar-se, ja que els nous marcadors de pronòstic indiquen que al voltant del 50% de pacients assignats a observació tenen una o més característiques que anuncien un mal pronòstic. A mesura que els nous marcadors de pronòstic es vagin fent més disponibles es podrà canviar l'aproximació al tractament dels pacients, i tractar de manera ràpida aquells pacients amb mal pronòstic (Chiorazzi *et al.*, 2005).

Antigament s'intentava controlar la malaltia, i aconseguir que fos indolent crònica. Avui en dia es busca aconseguir una remissió llarga, com a mínim en el grup de pacients que tenen una malaltia indolent. Aquesta remissió es defineix com la negativitat per la malaltia mínima residual (MRD, *minimal residual disease*), ja que aquesta negativitat s'associa a millor pronòstic (Pleyer *et al.*, 2009). En aproximadament un 20% de pacients amb LLC no s'aconsegueixen controlar la malaltia amb les teràpies clàssiques (Pleyer *et al.*, 2009). En general, el temps de supervivència mig és de 8-12 anys a partir del diagnòstic (Rozman *et al.*, 1995).

El tractament sol iniciar-se quan es dona alguna evidència de la progressió de la malaltia, com augment de les masses limfàtiques o de la melsa, pèrdua progressiva dels nivells d'hemoglobina o plaquetes, augment del número absolut de limfòcits en sang ($>150-200 \cdot 10^9$ cèl·lules/L) o complicacions autoimmunes com l'anèmia hemolítica o la trombocitopènia autoimmune (Wierda *et al.*, 2006; Gribben, 2009). El ràpid diagnòstic i el tractament de les infeccions i l'aplicació de la teràpia més adient són crítics per assegurar una llarga esperança de vida pels pacients. Les opcions terapèutiques actuals són variades i inclouen el tractament amb drogues antineoplàsiques (principalment anàlegs de purina i agents alquilants), amb anticossos monoclonals i transplant de medul·la òssia (Figura 1.23). La resistència a la quimioteràpia es deu sobretot a la inhibició o bloqueig de la inducció d'apoptosi per l'aparició de noves mutacions, com és el cas de p53 o la inactivació d'ATM, que suposa una alternativa freqüent d'alteració de la via de p53. Les alteracions en aquesta via donen resistència a la quimioteràpia (Pleyer *et al.*, 2009). Existeixen altres vies per generar resistència, com la presència de senyals intra o extracel·lulars que indueixen la supervivència de les cèl·lules de LLC. També s'ha descrit que la sobreexpressió de BCL-2 que presenten les cèl·lules de LLC potencia la longevitat d'aquestes cèl·lules i també s'associa a la baixa resposta a la quimioteràpia i a una disminució en la supervivència (Schimmer *et al.*, 2003). La sobreexpressió de MCL-1L que presenten alguns pacients també està associada a la baixa resposta a la quimioteràpia (Saxena *et al.*, 2004).



Figura I.23. Una aproximació al tractament inicial en pacients amb LLC simptomàtica. BMT indica transplant de medul·la òssia (Modificat de Byrd *et al.*, 2004).

3.11.1. AGENTS ALQUILANTS I ANÀLEGS DE PURINES.

La quimioteràpia és la primera opció terapèutica pels malalts de LLC. Durant les últimes dècades, l'agent alquilant clorambucil ha estat el tractament d'elecció, sol o en combinació amb altres fàrmacs, com els corticosteroids (glucocorticoids), doxorubicina o vincristina. Amb el tractament amb clorambucil en pacients no prèviament tractats s'arriben a aconseguir remissions parcials del 60%-70% però no s'aconsegueixen remissions completes. Altres combinacions d'agents alquilants que s'utilitzen freqüentment en teràpia són CVP (ciclofosfamida, vincristina, prednisona) o ChOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona), amb millor resposta que el clorambucil però sense canvis en la supervivència (Dighiero *et al.*, 1998).

Actualment, el tractament d'elecció pel tractament de la LLC són els anàlegs de purines. Són anàlegs de nucleòsids que inhibeixen l'ADN-polimerasa i la ribonucleòtid reductasa, induint apoptosi. La fludarabina principalment, i la 2-clorodeoxiadenosina i la pentostatina són els anàlegs de purines més utilitzats en el tractament de síndromes limfoproliferatives cròniques. Es tracta de fàrmacs amb altes taxes d'efectivitat com tractament de primera línia, però molts tumors es tornen resistents i a més, presenten resistència creuada. Aquests fàrmacs utilitzen la via de p53 per induir apoptosi, i perden eficàcia quan hi ha alteracions de p53 o ATM (Austen *et al.*, 2005). Els anàlegs de purina i les seves combinacions tenen millor grau de resposta que el clorambucil, i recentment s'ha vist que això es tradueix en una millora de la supervivència a llarg plaç, que resulta evident a partir dels 6 anys post-tractament (Rai KR *et al.*, 2009). La LLC té molt poques alternatives terapèutiques quan els pacients no responen a la teràpia amb anàlegs de purines.

3.11.2. ANTICOSSOS MONOCLONALS.

Durant els últims anys s'han desenvolupat noves opcions terapèutiques per la LLC, especialment anticossos monoclonals dirigits contra cèl·lules tumorals. Els anticossos monoclonals poden realitzar el seu efecte antitumoral a través de diferents mecanismes, entre ells la fixació i l'activació del sistema del complement, la inducció de citotoxicitat dependent de l'anticòs i l'activació de vies de transducció de senyals que altera la biologia de la cèl·lula.

El rituximab (MabThera[®], Rituxan[®]) és un anticòs quimèric d'humà i ratolí dirigit contra el marcador de membrana CD20. La seva eficàcia depèn dels nivells d'expressió de la proteïna CD20. Però les cèl·lules de LLC expressen nivells variables i generalment baixos del marcador CD20, i l'eficàcia del rituximab com agent únic és limitada en la LLC.

Diversos estudis mostren resultats prometedors en la combinació del rituximab amb altres fàrmacs, especialment la fludarabina, i actualment, la seva administració en combinació amb fludarabina i ciclofosfomida és un dels tractaments més utilitzats (Gribben, 2009). L'estudi del grup alemany CLL8 ha demostrat que la combinació de Rituximab, Fludarabina i Ciclofosfamida millora la supervivència respecte la combinació de fludarabina i ciclofosfamida (Hallek *et al.*, 2009), i aquesta triple combinació es considera actualment la primera línia de teràpia per la LLC.

Malauradament, amb aquesta teràpia s'han descrit síndromes de lisi i morts en pacients amb molta càrrega de limfòcits circulant, sembla que degut al gran nombre de citocines alliberades (Huhn *et al.*, 2001). El mecanisme d'acció *in vivo* no es coneix amb exactitud, però disminueixen MCL-1 i XIAP i aquest efecte podria sensibilitzar les cèl·lules a ser atacades per altres compostos (Reed *et al.*, 2002). Els pacients amb deleció en 17p no responen bé a la teràpia amb rituximab (Byrd *et al.*, 2006). Actualment s'està estudiant els efectes del ofatumumab (Arzerra[®]), un anticòs també contra CD20, totalment humanitzat, i que s'uneix a un epítip de CD20 diferent del rituximab. Estudis preliminars mostren que és més eficaç que el rituximab en pacients de LLC, i es creu que podria tenir efecte en pacients amb del17p. Aquest augment d'eficàcia podria ser degut a una unió a CD20 més estable (O'Brien, 2008).

Un altre anticòs que s'utilitza és el dirigit contra el marcador CD52. L'alemtuzumab (Campath-1[®]) és una forma humanitzada d'un anticòs anti-CD52 de rata. Diferents estudis mostren bons resultats en pacients prèviament tractats, resistents als tractaments clàssics o amb alteracions en p53 i com primera línia de tractament (Rai *et al.*, 2002). Malauradament, alemtuzumab també afecta als limfòcits B i T normals, i l'ús provoca immunosupressió, requerint l'administració conjunta d'antibiòtics per la prevenció de la infecció (Wadhwa *et al.*, 2006).

3.11.3. ALTRES TRACTAMENTS I COMBINACIONS.

Els inhibidors de topoisomerasa, doxorubicina i mitoxantrona, i els glucocorticoides com la prednisona s'utilitzen com segona línia de fàrmacs i gairebé sempre en combinació.

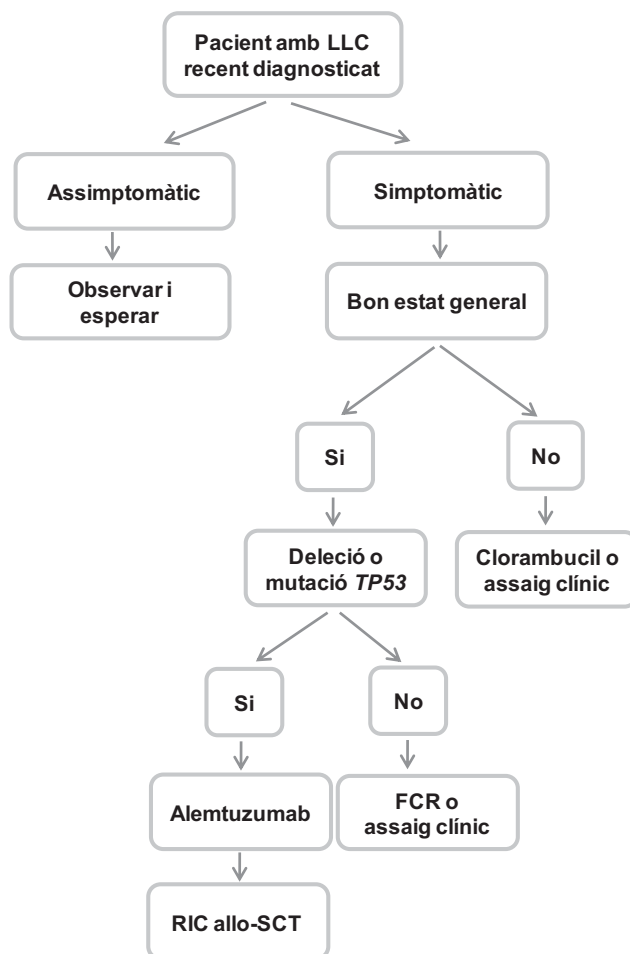


Figura I.24. Com tractar la LLC, adaptat de Gribben, 2009. FCR (fludarabina, ciclofosfamida i rituximab); RIC allo-SCT (*reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplant*)

3.11.4. PROBLEMES DE LA TERÀPIA ACTUAL.

La taxa de remissió completa aconseguida amb la quimioteràpia ha augmentat amb l'ús de teràpies combinades. Malauradament, els mecanismes de quimioresistència i els efectes secundaris, especialment mielosupressió i immunosupressió, dels actuals agents quimioterapèutics en limiten l'ús. Aproximadament en el 20% dels malalts de LLC no s'aconsegueix el control de la malaltia amb les teràpies convencionals (Pleyer *et al.*, 2009), i en molts apareixen recaigudes i resistències al tractament. La majoria de tractaments no són selectius per les cèl·lules tumorals, essent aquesta la causa dels efectes adversos que en molts casos poden causar inclús la suspensió del tractament. En el cas de la LLC, un dels principals efectes secundaris és la immunosupressió, ja que *per se*, el pacient de LLC té compromesa la

resposta immunològica. També és important considerar que la principal complicació i primera causa de mort en els pacients de LLC és l'aparició d'infeccions (Wadhwa *et al.*, 2006).

Un altre factor limitant en l'ús de la quimioteràpia és l'aparició de resistències al tractament. La resistència a un fàrmac es pot produir a diferents nivells: entrada del fàrmac, metabolisme a la forma activa, canvis en la diana i alteracions en les proteïnes que intervenen en el seu mecanisme d'acció. Una de les principals causes de resistència és la desactivació de la via de dany a l'ADN, sobretot la pèrdua de funció de p53, que dona lloc a la resistència als agents citotòxics. Per exemple, en pacients amb delecions 17p s'observa resistència a la fludarabina. Tot i tractar-los amb teràpies agressives, aquests pacients sobreviuen menys d'un any (Pleyer *et al.*, 2009).

Per tant, és necessari identificar nous agents amb toxicitat selectiva per cèl·lules B malignes i que utilitzin mecanismes d'acció diferents als mecanismes d'acció ja coneguts (Byrd *et al.*, 2006).

3.11.5. NOUS TRACTAMENTS.

Actualment hi ha més de 100 compostos en desenvolupament pel tractament de la LLC, i més de 900 assajos clínics en marxa (www.clinicaltrials.gov). Entre els compostos més interessants en desenvolupament podem trobar (revisat a O'Brien, 2008):

- Agents alquilants, com la bendamustina. Es va desenvolupar durant els anys 60, com un agent alquilant. Ha estat molt utilitzat pel tractament d'hematologies malignes a Alemanya, i recentment s'ha demostrat que té un mecanisme d'acció diferent dels agents alquilants. Actualment està autoritzat pel tractament de LLC i s'està assajant en combinació amb rituximab.
- Moduladors del sistema immune, com la lenalidomida, un anàleg de la talidomida que ha demostrat activitat antitumoral en desordres hematològics (mieloma múltiple i síndrome mielodisplàsic). A diferència de molts quimioterapèutics, d'administració intravenosa, la lenalidomida és d'administració oral. Actualment està en fase II.
- Inhibidors de CDKs (*cyclin dependent kinase*), com el Flavopiridol, una isoflavona sintètica que ha demostrat tenir activitat antitumoral in vitro de manera independent de p53. Actualment s'està assajant en pacients refractaris a la fludarabina.
- Inhibidors de la família de BCL-2: En aquest grup trobem tres compostos en fases bastant avançades del desenvolupament. L'oblimersen és un oligonuclèotid *antisense* que regula de manera negativa BCL-2 de manera dosi i temps dependent, i els pacients amb els que s'ha obtingut millor resposta són sensibles a fludarabina. Actualment està pendent d'aprovació per la FDA (*Food and Drug Administration*). L'obatocclax és un inhibidor de tots els membres antiapoptòtics de la família BCL-2, i

actualment està en fase I. L'ABT-263 també és un inhibidor dels membres antiapoptòtics de la família BCL-2, però no inhibeix MCL-1 ni BFL-1/A1. És d'administració oral i actualment està en fase II.

- Inhibidors de tirosina quinases, com el dasatinib. Actualment està aprovat per la FDA (*Food and Drug Administration*) pel tractament de leucèmia mieloide aguda i actualment està en fase II per la LLC.
- Acadesina, un precursor de la síntesi de nucleòtids, ha demostrat baixa toxicitat *in vitro* (només indueix apoptosi en les cèl·lules B de LLC i no en els limfòcits T), i el seu efecte és independent de p53. Actualment està en fase I/II.

3.11.6. LA VIA DE PKC/PI3K/AKT COM A DIANA TERAPÈUTICA.

La via de PI3K/Akt és crucial en molt aspectes del creixement i la supervivència cel·lular (Hennessy *et al.*, 2005). Es calcula que entre un terç i la meitat de tots els càncers tenen alguna alteració en aquesta via de senyalització. Així doncs, aquesta via és una diana molt atractiva pel desenvolupament de noves teràpies més selectives. L'any 2005 ja hi havia més de 20 companyies farmacèutiques desenvolupant inhibidors d'aquesta via i actualment, hi ha varis compostos en assajos clínics (Taula I.6).

S'ha demostrat que cada isoforma de PI3K participa en la senyalització de processos específics, de manera no redundant amb les altres isoformes. En tumors, només s'han trobat mutacions en p110 α i translocacions en p85 α . Això suggereix que serà necessari desenvolupar inhibidors específics per a cada una de les isoformes de PI3K, per tal de disminuir la toxicitat (Hennessy *et al.*, 2005).

Històricament, s'han utilitzat dos inhibidors químics per estudiar les funcions de PI3K: (1) la wortmanina, un metabòlit fúngic que inicialment es va aïllar de *Aniquilim Portman* el 1957 (Markman *et al.*, 2009), i que inhibeix irreversiblement p110 reaccionant covalentment amb el centre catalític (Devies *et al.*, 2000); (2) i el LY294002, un derivat de flavonoides, sintetitzat a partir de la quercetina, que inhibeix reversiblement totes les PI3K de classe I, i és unes 500 vegades menys potent que la wortmanina (Markman *et al.*, 2009). Malauradament, s'ha demostrat que tots dos compostos inhibeixen altres quinases de manera inespecífica (Bain *et al.*, 2007).

S'han desenvolupat nous compostos per tal d'incrementar els perfils farmacocinètics, aconseguir una especificitat pel substrat més gran i per tant, minimitzar la toxicitat. Alguns d'aquests compostos són inhibidors purs de PI3K, o selectius per alguna de les isoformes, mentre que altres són inhibidors duals de PI3K i mTOR.

Inhibidor	Companyia	Diana molecular	Malaltia
SF1126	Semaphore Pharmaceuticals	PI3K/mTOR, DNA-PK	Tumors sòlids, Mieloma múltiple
XL147	Exelixis	PI3K	Tumors sòlids
XL765	Exelixis	PI3K/mTOR	Tumors sòlids, glioblastoma
NVP-BEZ235	Novartis	PI3K/mTOR	Tumors sòlids, càncer de mama
NVP-BTG226	Novartis	PI3K/mTOR	Tumors sòlids, càncer de mama, síndrome de Cowden
NVP-BKM120	Novartis	PI3K	Tumors sòlids
GDC-0941	Genentech/Piramed Pharma	PI3K/mTOR (dèbil)	Tumors sòlids
PX-866	ProIX Pharmaceuticals	PI3K	Tumors sòlids
GSK105961	GlaxoSmithKline	PI3K	Tumors sòlids, càncer de mama i d'endometri, limfoma
CAL-101	Calistoga Pharmaceuticals	PI3K-p110 específic	LLC, limfoma no-Hodgking, leucèmia mieloide aguda

Taula I.6. Inhibidors de PI3K que actualment estan en assajos clínics. Adaptat de Markman *et al.*, 2009.

La inhibició de PKC també és una diana molt prometedora, i actualment hi ha més de 20 assajos clínics pel tractament de leucèmia i altres càncers (per exemple de pulmó), diabetis i retinopatia diabètica, entre d'altres (www.clinicaltrials.gov).

Uns altres compostos que també estan en desenvolupament clínic són els anàlegs d'alquilfosfolípids. Tal i com veurem més detalladament en el capítol 4 d'aquesta memòria, són compostos que interfereixen en les vies d'apoptosi i de supervivència cel·lular a diferents nivells, i indueixen apoptosi. Concretament, perifosina està en assajos pel tractament del mieloma múltiple (www.clinicaltrials.gov).

Així doncs, tal i com hem repassat en aquesta introducció, la via de PKC/PI3K/Akt sembla estar jugant un paper molt important en les cèl·lules de leucèmia limfocítica crònica, i la seva inhibició és una prometedora via d'intervenció terapèutica pel tractament de la LLC.

OBJECTIUS

OBJECTIUS

L'objectiu d'aquesta tesi doctoral ha estat estudiar la regulació de la via de PKC/PI3K/Akt, i els efectes de la seva inhibició en la supervivència de les cèl·lules de LLC.

Aquest objectiu s'ha desglossat en 4 punts:

1. Analitzar la regulació de la fosforilació d'Akt, la basal i la induïda per diferents factors de supervivència, i la seva implicació en la supervivència de les cèl·lules de LLC.
2. Estudiar l'efecte d'inhibidors d'Akt en les cèl·lules de LLC.
3. Estudiar el paper de cada una de les isoformes de PI3K de classe I en la supervivència de les cèl·lules de LLC mitjançant inhibidors selectius.
4. Estudiar l'efecte dels alquilfosfolípids edelfosina i perifosina en les cèl·lules de LLC.

RESULTATS

CAPÍTOL 1.
REGULACIÓ D'AKT PER VIES
DEPENDENTS I INDEPENDENTS DE PI3K
EN LES CÈL·LULES DE LLC: PAPER DE PKC β

Introducció.

En el nostre grup, ja s'havia descrit la importància de la via PI3K/Akt en la supervivència dels limfòcits de LLC (Barragan *et al.*, 2002, Barragan *et al.*, 2003, tesi doctoral M. Barragán 2002). Així doncs, ja sabíem que les cèl·lules de LLC presenten una activitat basal de les quinases PKC i PI3K de classe I. La inhibició de PKC amb Bisindolylmaleimide I (Bis I) i de PI3K amb LY294002, indueix apoptosi en les cèl·lules de LLC cultivades *ex vivo*. També sabíem que els limfòcits B de LLC eren més sensibles a la inhibició de PI3K que els limfòcits T (Barragan *et al.*, 2002).

A més, la Dra. Montserrat Barragán havia demostrat que la Ser473 d'Akt es trobava fosforilada de manera basal en les cèl·lules de LLC fresques, però aquesta fosforilació es perdia al criopreservar-les. També havia comprovat que l'èster de forbol PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*) induïa la fosforilació d'Akt en Ser473 de manera independent de PI3K, ja que la incubació amb LY294002 no la bloquejava. p38-MAPK, mTORC1 i quinases de Calmodulina no estaven implicades en aquesta fosforilació, ja que la incubació amb els inhibidors respectius d'aquestes quinases, SB203580, Rapamicina i W12 no van bloquejar la fosforilació induïda per PMA en les cèl·lules de LLC.

Aquesta fosforilació en Ser473 semblava exclusiva de les cèl·lules de LLC, ja que en cap de les línies estudiades en la tesi de la Dra. Montserrat Barragán es va veure la inducció de fosforilació en aquest residu per PMA. Les línies analitzades van ser EHEB (*human B-cell chronic lymphocytic leukemia*), JVM-2 (*human B-prolymphocytic leukemia*), BAF-3 (*mouse pro B cells*), HeLa (*human cervix carcinoma*) i Swiss 3T3 (*Mouse Swiss Albino embryo fibroblasts*).

Tenint en compte tots aquests antecedents, en aquesta primera part de la tesi, vam voler descriure millor el mecanisme de fosforilació d'Akt en les cèl·lules de LLC. Hem estudiat la fosforilació basal i la induïda per factors de supervivència, com l'interleuquina-4 (IL-4), el *stromal cell-derived factor-1 α* (SDF1 α), l'activació del receptor de cèl·lules B (BCR) i el PMA.

Resultats.**Paper de PI3K i PKC en la fosforilació basal d'Akt i en la viabilitat de les cèl·lules de LLC.**

En primer lloc vam analitzar l'estat de fosforilació basal d'Akt en cèl·lules de LLC fresques i criopreservades. Vam estudiar la fosforilació basal d'Akt en els residus Ser473 i Thr308 en una mateixa mostra, recent separada (fresca) i després de congelar/descongelar. Vam veure que la fosforilació d'Akt en aquests dos residus es perdia després d'un cicle de congelació/descongelació (Figura C1.1). També vam observar que en algunes mostres, degut a alts nivells de fosforilació en les cèl·lules fresques, aquesta fosforilació disminuïa però no desapareixia del tot després d'un cicle de congelació/descongelació (com per exemple el Pacient 414_143/04 de la Figura C1.1).

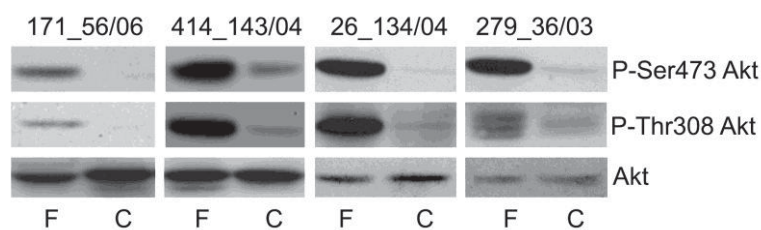


Figura C1.1. Akt està fosforilada en Ser473 i Thr308 en cèl·lules fresques de LLC. Cèl·lules de LLC fresques recent separades van ser lisades 1 hora després de la purificació de sang perifèrica (fresques, F) o 1 hora després de la seva descongelació (criopreservades, C). Les cèl·lules es van lissar i els extractes totals es van analitzar per Western blot tal i com s'ha descrit a "Pacients, materials i mètodes". Es mostren els resultats representatius de mostres fresques/criopreservades de 4 dels 12 pacients analitzats, i s'indica el número de pacient i mostra a la part superior de la figura.

També vam observar que aquesta fosforilació basal d'Akt present en les cèl·lules fresques de LLC era dependent de PI3K, ja que al incubar les cèl·lules de LLC amb l'inhibidor de PI3K LY294002 vam observar una disminució en la fosforilació dels residus Ser473 i Thr308 en la majoria de mostres analitzades (7 de 10, Figura C1.2, Pacients 24_65/05, 69_128/06 i 48_66/05). A més, en 3 de les 10 mostres estudiades vam observar que la fosforilació basal d'Akt era dependent de PKC, ja que la incubació de les cèl·lules de LLC amb un inhibidor de PKC, Bis I, disminuïa la fosforilació en Ser473 i Thr308 (Figura C1.2, Pacient 69_128/06), o la fosforilació en Ser473 (Figura C1.2, Pacient 48_66/05). Finalment, en altres mostres (3 de 10) la fosforilació basal d'Akt no es veia afectada després del tractament amb els inhibidors de PI3K o PKC (Figura C1.2, Pacient 447_44/05). Aquests resultats suggereixen que en la majoria de pacients, la via de PI3K és la majoritària en el manteniment de la fosforilació basal d'Akt. Una via dependent de PKC també hi participa en alguns pacients, i hi ha altres vies, independents de PI3K i de PKC que també juguen un paper en el manteniment de la fosforilació basal d'Akt.

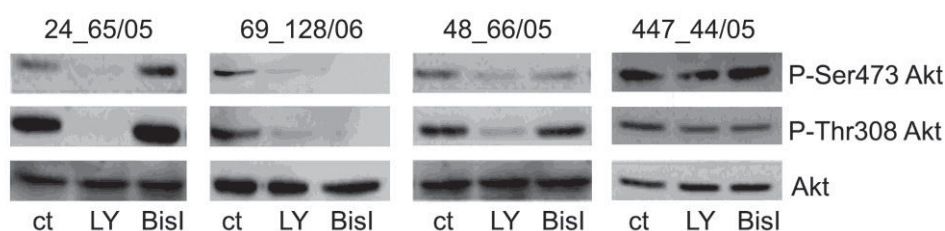


Figura C1.2. La fosforilació basal d'Akt present en les cèl·lules de LLC és bloquejada per la inhibició de PI3K i PKC. Cèl·lules fresques de LLC es van incubar 1 hora en presència de LY294002 20 μ M (LY), Bis I 5 μ M o medi sol (ct). Les cèl·lules es van lisar i els extractes totals es van analitzar per Western blot tal i com s'ha descrit a "Pacients, materials i mètodes". Es mostren resultats representatius de mostres fresques de 4 dels 10 pacients analitzats (a la part superior de la figura s'indica el número de pacient i mostra).

A continuació vam voler reproduir el que s'havia descrit prèviament (Barragan *et al.*, 2002): que tots dos inhibidors eren capaços d'induir apoptosi en les cèl·lules de LLC. La incubació amb LY294002 20 μ M o Bis I 5 μ M durant 24 hores va induir apoptosi en les cèl·lules de LLC (Figura C1.3A). A més, amb la combinació de tots dos inhibidors vam observar un efecte additiu en l'apoptosi de les cèl·lules de LLC, tant a 24 com a 48 hores (Figura C1.3B). Aprofitant que al laboratori disposàvem d'un altre inhibidor de la via de PI3K, la wortmanina, vam incubar les cèl·lules de LLC durant 48 hores amb aquest inhibidor, i vam comprovar que també induïa apoptosi, confirmant els resultat obtinguts amb el LY294002 (Figura C1.3C). Aquests resultats confirmen que vies dependents de PI3K i de PKC són responsables del manteniment de la viabilitat basal en les cèl·lules de LLC.

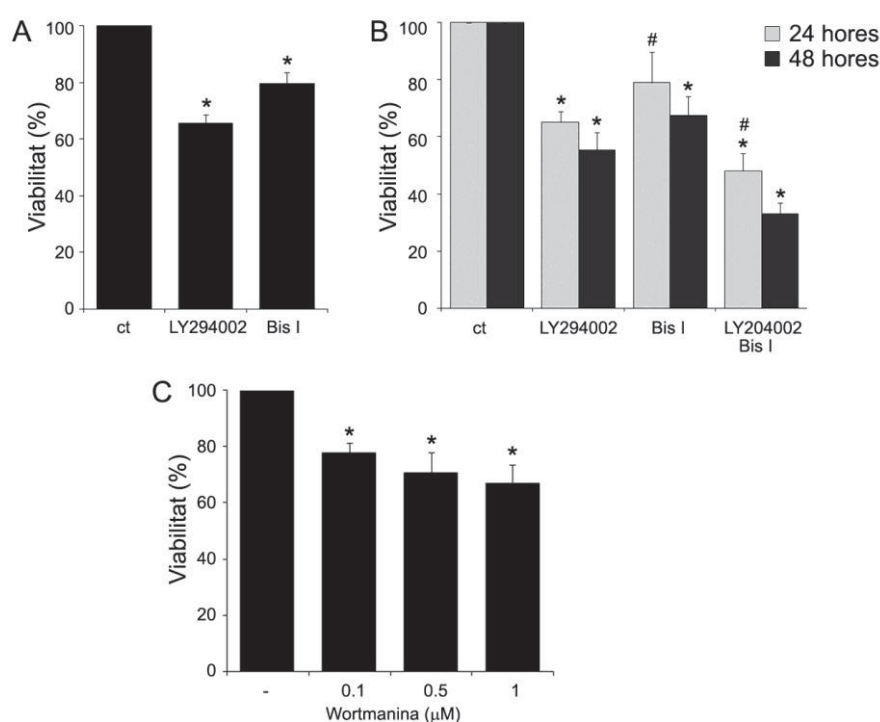


Figura C1.3. Efecte dels inhibidors de PI3K i PKC, i la seva combinació en les cèl·lules de LLC. (A) Les cèl·lules de LLC es van incubar durant 24 hores amb LY294002 20 μ M o Bis I 5 μ M (n = 37). (B) Cèl·lules de LLC es van incubar durant 24 hores (n = 9, barres grises) o 48 hores (n = 11, barres negres) amb LY294002 20 μ M, Bis I 5 μ M o la combinació de tots dos inhibidors. (C) Cèl·lules de LLC es van incubar durant 48 hores amb wortmanina 100 nM (0.1, n = 6), 500 nM (0.5, n = 6) o 1 μ M (n = 9). Es va mesurar la viabilitat per l'anàlisi de l'exposició de fosfatidilserina i captació d'IP, tal i com es descriu a "Pacients, materials i mètodes". La viabilitat està expressada com el percentatge sobre la viabilitat de les cèl·lules sense tractar. Les dades es mostren com el valor de la mitjana \pm SEM. (A, C) * p <0.005 cèl·lules tractades *versus* control. (B) * p <0.005 cèl·lules tractades amb LY294002 o Bis I *versus* control, LY294002+Bis I *versus* control, LY294002 (48h), i Bis I; # p <0.05 Bis I *versus* control, LY294002+Bis I *versus* LY294002 (24h).

Efecte diferencial dels inhibidors de PI3K i PKC en cèl·lules B i T de LLC i de donants sans.

També vam analitzar la sensibilitat diferencial de les cèl·lules B i T a l'apoptosi induïda pels inhibidors LY294002 i Bis I en les cèl·lules de LLC. El número de cèl·lules B (CD19⁺) i T (CD3⁺) viables es va mesurar en una mostra exposada durant 24 hores a LY294002 20 μ M o Bis I 5 μ M. El tractament amb tots dos inhibidors va disminuir el percentatge de cèl·lules B viables, però no va afectar a la viabilitat de les cèl·lules T (Figura C1.4A). També vam comprovar els efectes de la incubació amb aquests inhibidors en cèl·lules B (CD19⁺) i T (CD3⁺) de donants sans. Igual que en les cèl·lules B i T de pacients de LLC, la incubació amb LY294002 20 μ M i Bis I 5 μ M durant 24 hores, va afectar la viabilitat de les cèl·lules B, però no a les cèl·lules T (Figura C1.4B). Aquests resultats indiquen que les cèl·lules B són més sensibles que les cèl·lules T a la inhibició de les vies de PI3K i PKC.

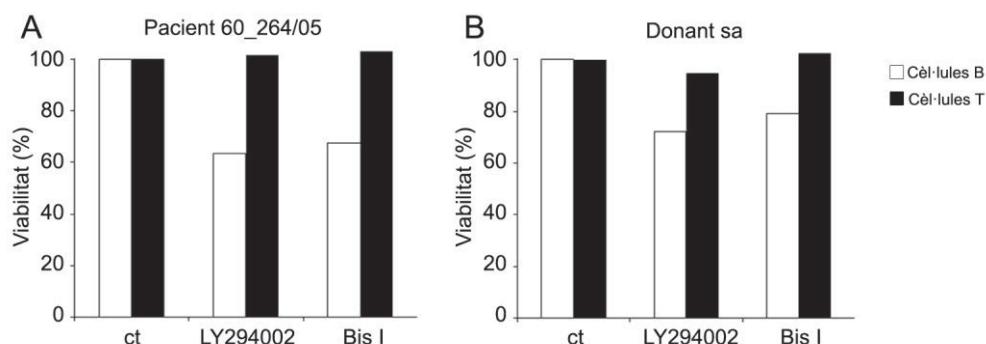


Figura C1.4. Efecte dels inhibidors LY294002 i Bis I en les cèl·lules B i T de LLC i de un donant sa. Cèl·lules de un pacient de LLC (A) i d'un donant sa (B) van ser incubades durant 24 hores amb medi sol o amb LY294002 20 μ M o Bis I 5 μ M. La viabilitat es va mesurar com cèl·lules no apoptòtiques B CD3⁻/CD19⁺ (barres blanques) o cèl·lules no apoptòtiques T CD3⁺/CD19⁻ (barres negres). La viabilitat està expressada com el percentatge sobre la viabilitat de les cèl·lules sense tractar, i es mostren els resultats d'una mostra de LLC i d'un donant sa.

Efecte dels factors de supervivència en la fosforilació d'Akt.

Haviem demostrat l'existència de la fosforilació basal d'Akt, però quins eren els factors de supervivència encarregats de mantenir-la? Vam començar estudiant dos dels factors de supervivència més ben descrits per les cèl·lules de LLC: la IL-4 (interleuquina-4) (Dancescu *et al.*, 1992) i el SDF-1 α (*stromal cell-derived factor-1 α*) (Burger *et al.*, 2000), sintetitzats respectivament pels limfòcits T i les cèl·lules *nurse-like*. El nostre grup ja havia descrit que la IL-4 induïa un augment en la viabilitat dels limfòcits de LLC en la majoria de mostres, i aquest augment era dependent de PI3K, ja que el LY294002 el bloquejava (Barragan *et al.*, 2002). També s'havia descrit que el SDF-1 α era capaç de protegir les cèl·lules de LLC de l'apoptosi espontània (Burger *et al.*, 2000). Així doncs, vam incubar les cèl·lules de LLC amb IL-4 10

ng/mL i SDF-1 α 50 ng/mL, i vam comprovar que totes dues citoquines induïen la fosforilació d'Akt en els residus Ser473 i Thr308, i aquestes fosforilacions eren inhibides per LY294002, però no per Bis I, indicant que tant IL-4 com SDF-1 α induïen la fosforilació d'Akt per una via dependent de PI3K (Figura C1.5, es mostren resultats amb SDF-1 α).

Un altre factor candidat al manteniment de la fosforilació basal d'Akt en les cèl·lules de LLC era l'activació del receptor de cèl·lules B (BCR). S'havia descrit que la incubació de les cèl·lules de LLC amb IgM induïa la fosforilació d'Akt en Ser473 (Bernal *et al.*, 2001; Nedellec *et al.*, 2005; Petlickovski *et al.*, 2005). Així vam comprovar que la incubació de les cèl·lules de LLC amb IgM soluble, i per tant, l'activació del BCR, induïa la fosforilació d'Akt per una via dependent de PI3K i independent de PKC, ja que el LY294002 però no el Bis I bloquejava la fosforilació induïda per l'activació del BCR (Figura C1.5).

Un altre compost que induïx supervivència en les cèl·lules de LLC, i que s'havia estudiat al nostre grup, era el PMA, un èster de forbol (Barragan *et al.*, 2002). Sabíem que tot i ser un factor no fisiològic, la incubació de les cèl·lules de LLC amb PMA bloquejava l'apoptosi espontània al cultivar-les *ex vivo*. I que a més, el PMA induïa un augment en la fosforilació d'Akt en Ser473, no inhibible per LY294002. Vam estudiar si el PMA també induïa la fosforilació d'Akt en el residu Thr308, i per tant si induïa la completa activació d'Akt. Després de la incubació de les cèl·lules de LLC amb PMA 10 nM durant 10 minuts, vam observar un augment en la fosforilació de tots dos residus. A continuació, vam estudiar si aquesta fosforilació induïda per PMA era dependent o independent de PI3K, preincubant les cèl·lules de LLC amb LY294002 20 μ M i Bis I 5 μ M. Vam observar que el LY294002 no inhibia la fosforilació induïda pel PMA, mentre que el Bis I sí que la inhibia, indicant la participació de vies independents de PI3K i dependents de PKC en la fosforilació d'Akt induïda per PMA en les cèl·lules de LLC (Figura C1.5).

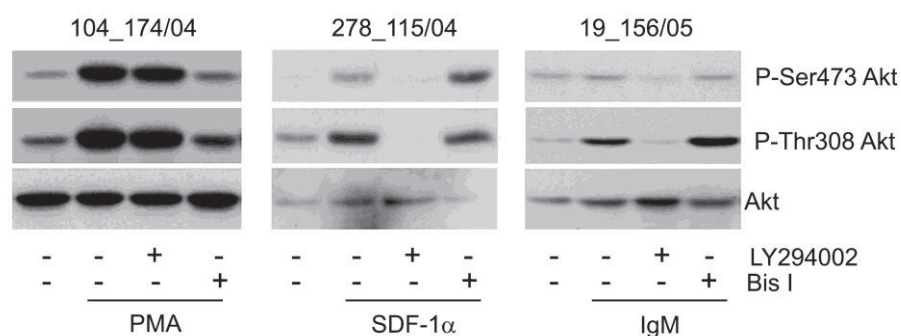


Figura C1.5. Fosforilació d'Akt de manera dependent i independent de PI3K en les cèl·lules de LLC. Cèl·lules criopreservades de LLC es van preincubar amb LY294002 20 μ M o Bis I 5 μ M durant 1 hora, abans del tractament amb PMA 10 nM, SDF-1 α 50 ng/ml o anti- IgM F(ab')₂ humà procedent de cabra 10 μ g/ml durant 20 minuts més (n = 3). Les cèl·lules es van lissar i els extractes totals es van analitzar per Western blot tal i com s'ha descrit a "Pacients, materials i mètodes". A la part superior de la figura s'indica el número de pacient i mostra.

Sabiem que a diferència de les cèl·lules de LLC, el PMA no induïa la fosforilació d'Akt en algunes línies cel·lulars. Així, vam voler estudiar si el PMA induïa la fosforilació d'Akt en limfòcits B i T de donants sans. En primer lloc, vam observar que les cèl·lules B normals tenien molt poca fosforilació basal d'Akt, mentre que les cèl·lules T no en tenien. A més, vam observar que de manera similar a les cèl·lules de LLC, el tractament de limfòcits humans B i T amb PMA va induir la fosforilació d'Akt en els residus Ser473 i Thr308, i aquesta fosforilació era inhibida per l'inhibidor de PKC Bis I. En contrast amb les cèl·lules de LLC i els limfòcits T, en els limfòcits B normals la fosforilació d'Akt induïda per PMA va ser inhibida per LY294002 (n = 2) (Figura C1.6).

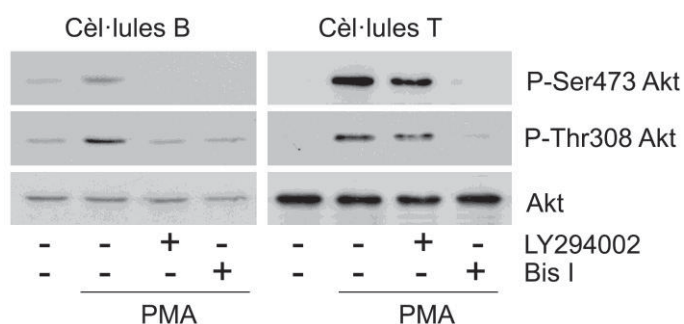


Figura C1.6. Fosforilació d'Akt de manera dependent i independent de PI3K en limfòcits B i T de donants sans. Limfòcits B i T normals recent separats (frescos) es van preincubar amb LY294002 20 μ M o Bis I 5 μ M durant 1 hora, abans del tractament amb PMA 10 nM durant 20 minuts (n = 2). Les cèl·lules es van lissar i els extractes totals es van analitzar per Western blot tal i com s'ha descrit a "Pacients, materials i mètodes".

La fosforilació d'Akt induïda per PMA activa Akt en les cèl·lules de LLC.

A continuació, vam analitzar si el tractament amb PMA incrementava l'activitat d'Akt en les cèl·lules de LLC, utilitzant un anticòs contra la seqüència consens de fosforilació de substrats d'Akt (Zhang *et al.*, 2002). Aquest anticòs reconeix els substrats que contenen i estan fosforilats en la seqüència de fosforilació d'Akt, per tant, dóna una mesura indirecta de l'estat d'activació de la quinasa Akt. Tal i com esperàvem, alguns substrats d'Akt estaven fosforilats en condicions basals en cèl·lules fresques de LLC, i el tractament amb LY294002 20 µM o Bis I 5 µM va disminuir aquesta fosforilació (Figura C1.7A). De manera important, el tractament amb PMA va augmentar la fosforilació de diversos substrats d'Akt. Els substrats d'Akt fosforilats més evidents tenien una massa molecular aparent de 30, 52, 66, 80, 95 i 120 kDa. La fosforilació d'aquestes proteïnes induïda pel PMA no va ser inhibida pel tractament amb el LY294002 (només la fosforilació de la proteïna de 30 kDa va disminuir lleugerament), i va ser completament bloquejada pel tractament amb Bis I. La proteïna de 30 kDa havia estat prèviament identificada com la proteïna ribosomal S6 (Zhang *et al.*, 2002). Utilitzant anticossos específics contra substrats coneguts d'Akt, vam identificar les proteïnes de 52 kDa com GSK-3β i la de 95kDa com a FoxO3a (Figura C1.7B).

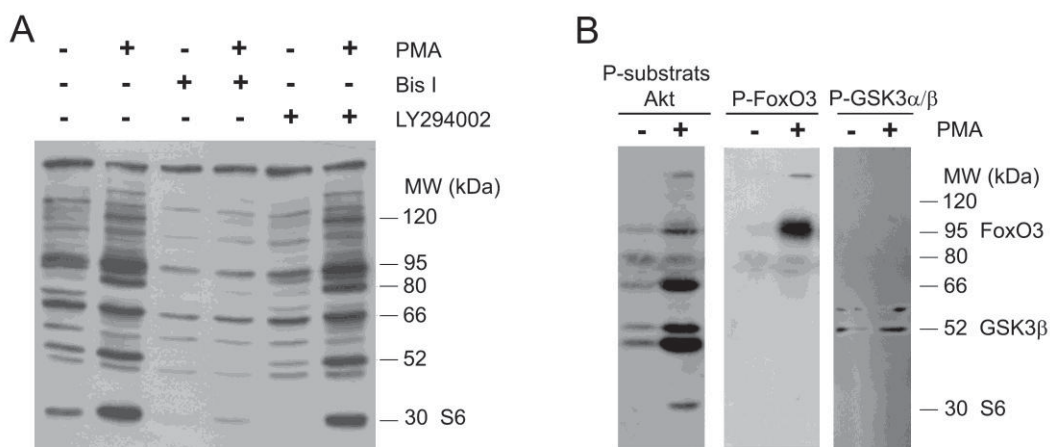


Figura C1.7. El PMA indueix l'activació d'Akt en les cèl·lules de LLC. (A) Cèl·lules criopreservades de LLC es van preincubar amb LY294002 20 µM o Bis I 5 µM durant 1 hora, abans del tractament amb PMA 10 nM durant 20 minuts. Les cèl·lules es van lissar i els extractes totals es van analitzar per Western blot tal i com s'ha descrit a "Pacients, materials i mètodes". (B) Cèl·lules criopreservades de LLC es van incubar amb PMA 10 nM durant 20 minuts. Les cèl·lules es van lissar i es van determinar els nivells dels P-substrats, de P-GSK3β, i de P-FoxO3a per Western blot tal i com s'ha descrit a "Pacients, materials i mètodes". Es mostra el resultat d'un pacient representatiu (A, pacient i mostra 186_52/03; B, pacient i mostra 171_48/06) (n = 3, A; n = 4, B).

A continuació vam estudiar si el PMA, a més a més d'induir la fosforilació d'Akt, també induïa un augment de la viabilitat de les cèl·lules de LLC, i si la inhibició de les vies de PI3K i PKC tenia algun efecte. Així, vam incubar les cèl·lules de LLC durant 24 hores amb PMA, LY294002, Bis I i la combinació de PMA amb els dos inhibidors. Tal i com s'havia descrit prèviament (Barragan *et al.*, 2002), el PMA va induir un efecte de supervivència en les cèl·lules de LLC, i la incubació amb LY294002 o Bis I va bloquejar parcialment aquest efecte de supervivència (Figura C1.8).

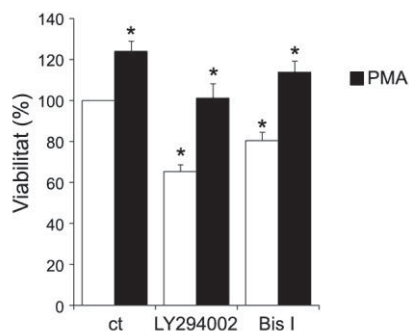


Figura C1.8. El PMA indueix una augment en la viabilitat de les cèl·lules de LLC. Les cèl·lules de LLC es van incubar durant 24 hores amb LY294002 20 μ M o Bis I 5 μ M i sense (barres blanques) o amb PMA 10 nM, (barres negres) (n = 12). Es va mesurar la viabilitat per l'anàlisi de l'exposició de fosfatidilserina i captació d'IP, tal i com es descriu a "Pacients, materials i mètodes". La viabilitat està expressada com el percentatge sobre la viabilitat de les cèl·lules sense tractar. Les dades es mostren com el valor de la mitjana \pm SEM. * $p < 0.005$ LY204002, Bis I i PMA versus control; PMA + LY204002 versus PMA o LY204002; PMA + Bis I versus PMA o Bis I.

Efecte dels inhibidors de proteïnes quinases en la fosforilació d'Akt induïda per PKC.

Per analitzar les vies de transducció de senyals involucrades en la fosforilació d'Akt induïda per PMA vam utilitzar inhibidors selectius de proteïnes quinases. No hem pogut utilitzar altres mètodes com siRNA (ARN d'interferència) i altres modificacions gèniques, ja que en el nostre model, les cèl·lules de LLC, aquestes tècniques tenen una eficiència de transfecció molt baixa i no donen bons resultats.

Tal i com s'ha demostrat prèviament, en les cèl·lules de LLC l'efecte de PMA sobre la fosforilació d'Akt va ser completament bloquejat per Bis I, un inhibidor selectiu de les isoformes clàssiques i noves de PKC (veure Figura C1.5).

Les vies de p38-MAPK i MEK són activades per sota de PKC (Marshall, 1996; Cai *et al.*, 1997). Així, vam estudiar amb inhibidors selectius d'aquestes quinases si aquestes vies estaven implicades en la fosforilació d'Akt induïda per PMA. La inhibició de p38 MAPK i MEK per SB203580 i PD98059, respectivament, no van afectar a la fosforilació d'Akt en Ser473 (Figura C1.9A).

A més, també vam utilitzar un inhibidor general de quinases, l'estaurosporina (Omura *et al.*, 1977; Gescher, 1998). Els nostres resultats mostren que la fosforilació d'Akt induïda per PMA va ser completament inhibida per estaurosporina 50 nM, indicant que una quinasa sensible a estaurosporina està implicada en aquesta fosforilació en cèl·lules de LLC. Vam estudiar una mica més en detall l'efecte de l'estaurosporina, i vam realitzar experiments de dosi-reposta, incubant les cèl·lules de LLC amb un rang de dosis d'estaurosporina (1 nM-1 μ M) durant 1 hora abans de l'estimulació amb PMA 10 nM. Vam observar que el tractament amb l'estaurosporina bloqueja la fosforilació d'Akt induïda per PMA de manera dosi-dependent (Figura C1.9B). A més, també vam estudiar l'efecte d'un inhibidor de tirosina quinases, la genisteïna (Spinuzzi *et al.*, 1994; Raynal *et al.*, 2008). També vam realitzar experiments de dosi-resposta (1 nM-10 μ M), i vam veure que bloquejava de manera dependent de dosi la fosforilació d'Akt induïda per PMA (Figura C1.9B). A més, utilitzant un anticòs contra la seqüència consens de fosforilació de PKC, vam observar que tots dos inhibidors van bloquejar la fosforilació dels substrats de PKC induïda per PMA. Com a control d'una inhibició específica de PKC vam utilitzar el Bis I (Figura C1.9C). Així doncs, aquests resultats suggerien que una quinasa sensible a l'estaurosporina i a la genisteïna estava implicada en la fosforilació d'Akt per PMA.

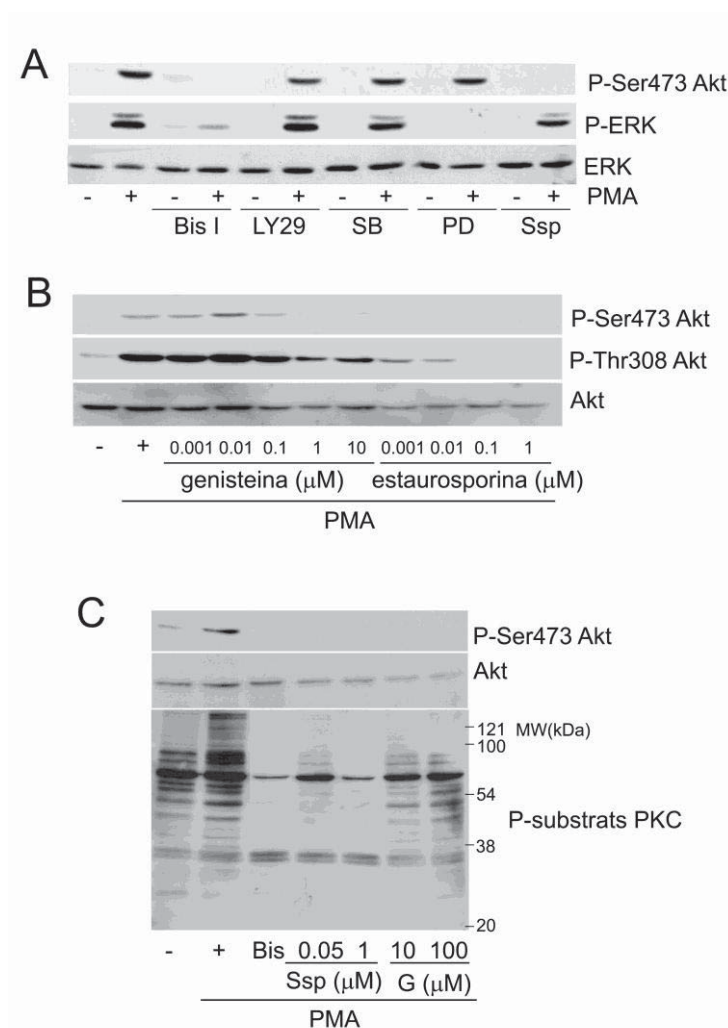


Figura C1.9. Efecte de diferents inhibidors de proteïnes quinases en la fosforilació induïda per PMA. (A) Cèl·lules criopreservades de LLC es van incubar amb Bis I 5 μM , LY294002 20 μM (LY), SB203580 10 μM (SB), PD98059 20 μM (PD) o estaurosporina 50 nM (Ssp) durant 1 hora abans de l'estimulació amb PMA 10 nM durant 20 minuts. (B) Cèl·lules criopreservades de LLC es van incubar amb una rang de dosis de genisteïna (1 nM-10 μM) i estaurosporina (1 nM-1 μM) durant 1 hora abans de l'estimulació amb PMA 10 nM durant 20 minuts. (C) Cèl·lules criopreservades de LLC es van incubar amb Bis I 5 μM , estaurosporina 50 nM o 1 μM (Ssp) o genisteïna 10 μM o 100 μM (G) durant 1 hora abans de l'estimulació amb PMA 10 nM durant 20 minuts. Es mostra el resultat d'un pacient representatiu (A, pacient 9; B, pacient i mostra 524_147/05; C, pacient i mostra 102_240/05) (n =4, A; n = 2, B i C).

A continuació vam estudiar l'efecte d'inhibidors d'Akt en la fosforilació induïda per PMA. En un primer moment vam provar amb dos inhibidors, el SH-5, que evita la unió dels PIP₃ al domini PH (Kozikowski *et al.*, 2003) i triciribine (Yang *et al.*, 2004), un inhibidor de la fosforilació d'Akt. Cap dels dos inhibidors va inhibir la fosforilació d'Akt induïda per PMA. Més endavant, vam provar un tercer inhibidor d'Akt, l'Akti-1/2. El tractament amb Akti-1/2, un inhibidor al·lostèric d'Akt (Barnett *et al.*, 2005; Logie *et al.*, 2007) va bloquejar lleugerament la fosforilació d'Akt en Ser473 i Thr308 induïda per PMA (Figura C1.10). Els efectes d'aquest inhibidor en les cèl·lules de LLC s'estudiaran en més detall en el següent capítol d'aquesta memòria.

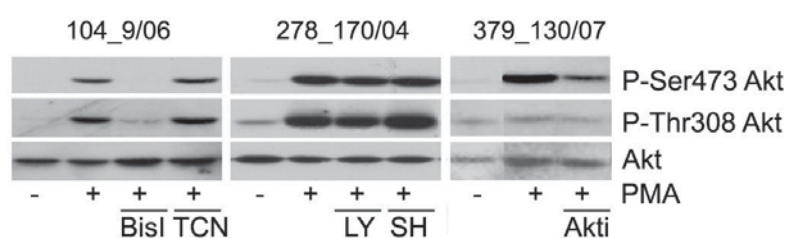


Figura C1. 10. Efecte d'inhibidors d'Akt en la fosforilació induïda per PMA. Cèl·lules criopreservades de LLC es van incubar amb Bis I 5 µM, Triciribine 1 µM (TCN), LY294002 20 µM (LY), SH-5 10 µM o Akti-1/2 5 µM (Akti) durant 1 hora abans de l'estimulació amb PMA 10 nM durant 20 minuts. Les cèl·lules van ser lisades i els extractes totals es van analitzar per Western blot tal i com s'ha descrit a "Pacients, materials i mètodes". Es mostra el resultat d'un pacient representatiu, i s'indica el número de pacient i mostra a la part superior de la figura (n = 3).

PKCβ induïx la fosforilació d'Akt de manera independent de PI3K en les cèl·lules de LLC.

Mentre estàvem desenvolupant aquest estudi, es va descriure que les isoformes clàssiques de PKC, particularment PKCβII, podia regular l'activitat d'Akt per fosforilació directa del residu Ser473 *in vitro* en mastòcits estimulats amb el receptor d'alta afinitat Fc per IgE (FcεRI) (Kawakami *et al.*, 2004). Així doncs, vam examinar si la fosforilació en Ser473 en les cèl·lules de LLC depenia de l'activitat d'aquesta isoforma de PKC. Per la realització d'aquests experiments vam utilitzar un inhibidor específic de PKCβ, el LY333531 (Jirousek *et al.*, 1996; Ruboxistaurin, 2007). En primer lloc, vam estudiar si la fosforilació basal d'Akt depenia d'aquesta isoforma. En un pacient on la fosforilació basal era dependent de PKC (Figura C1.11, pacient 104_174/04), vam observar que la incubació amb Bis I bloquejava pràcticament per complet la fosforilació basal d'Akt en Ser473 i Thr308, mentre que la incubació amb LY333531 només va aconseguir disminuir parcialment la fosforilació en tots dos residus. Vam estudiar dos pacients més on la fosforilació basal era dependent de PI3K, ja que el LY294002 bloquejava completament la fosforilació en Ser473 i Thr308, mentre que el Bis I no tenia cap efecte. En

aquest cas la incubació amb LY333531 tampoc va afectar l'estat de fosforilació d'Akt. Aquest resultat suggereix que en els pacients on la fosforilació basal és dependent de PKC, a més a més de PKC β , hi ha altres isoformes que podrien estar jugant un paper en la fosforilació d'Akt. En canvi, en els pacients on la fosforilació basal és dependent de PI3K, sembla que PKC β no participa en la fosforilació d'Akt.

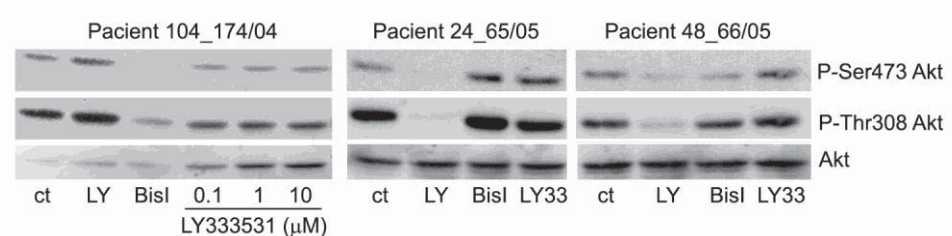


Figura C1.11. La inhibició de PKC β bloqueja parcialment la fosforilació basal d'Akt. Cèl·lules fresques de LLC es van incubar sense (ct) o amb LY294002 20 μ M (LY), Bis I 5 μ M o LY333531 0.1, 1 i 10 μ M (104_174/04) o 1 μ M (24_65/05 i 48_66/05) durant 1 hora. Les cèl·lules es van lissar i els extractes totals es van analitzar per Western blot tal i com s'ha descrit a "Pacients, materials i mètodes" (n = 3).

A continuació vam estudiar si les fosforilacions d'Akt en Ser473 i en Thr308 induïdes per PMA eren inhibides per l'inhibidor de PKC β LY333531. Vam realitzar experiments de dosi-resposta, i vam observar que el LY333531 bloquejava la fosforilació d'Akt induïda per PMA de manera dosi-dependent (Figura C1.12).

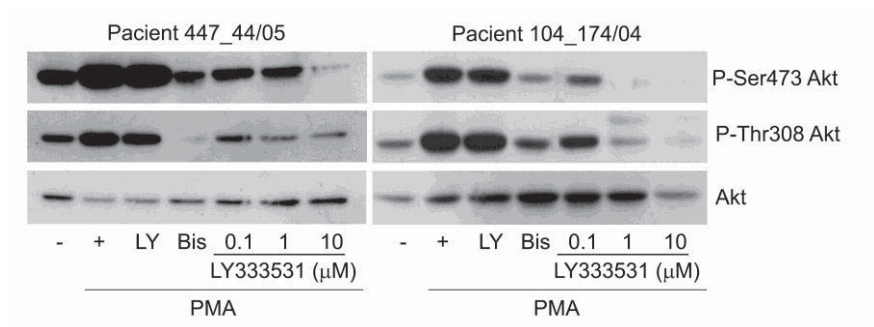


Figura C1.12. La inhibició de PKC β bloqueja la fosforilació d'Akt induïda pel PMA de manera dosi-dependent. Cèl·lules de LLC es van preincubar amb LY294002 20 μ M (LY), Bis I 5 μ M (Bis) o LY333531 0.1, 1 i 10 μ M durant 1 hora abans de la incubació amb PMA 10 nM durant 20 minuts. Les cèl·lules es van lissar i els extractes totals es van analitzar per Western blot tal i com s'ha descrit a "Pacients, materials i mètodes". Es mostren els resultats de dos pacients representatius (n = 2).

Experiments de temps-resposta van mostrar que la inhibició de PKC β bloquejava tant la fosforilació (Figura C1.13A) com l'activitat d'Akt (Figura C1.13B) induïda per PMA a tots els temps analitzats. A més, vam observar que el LY333531 també inhibia la fosforilació dels substrats d'Akt basal (Figura C1.13B, carrils de temps 0 minuts), indicant que una via dependent de PKC β activa Akt en les cèl·lules de LLC.

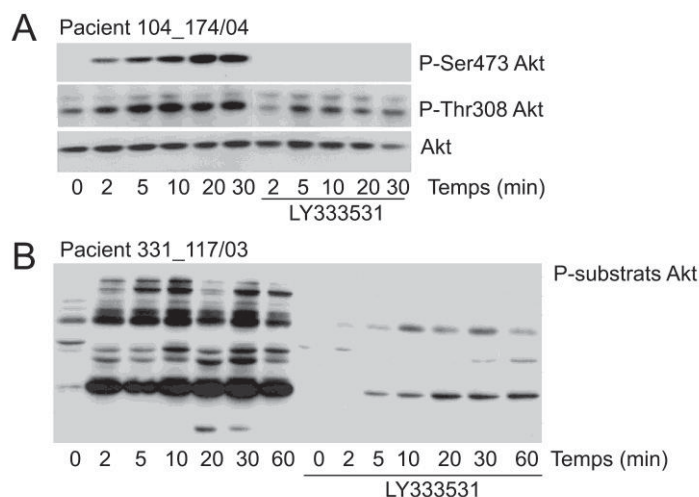


Figura C1.13. La inhibició de PKC β bloqueja la fosforilació i l'activitat d'Akt induïdes pel PMA de manera dependent del temps. Cèl·lules criopreservades de LLC es van preincubar amb LY333531 1 μ M durant 1 hora abans de la incubació amb PMA 10 nM durant els temps indicats. Les cèl·lules es van lisar i els extractes totals es van analitzar per Western blot tal i com s'ha descrit a "Pacients, materials i mètodes". Es mostra el resultat d'un pacient representatiu (n = 3).

Vam estudiar si PKC β estaria implicada en la fosforilació d'Akt induïda per altres factors de supervivència. Però contràriament al que succeïa amb PMA, PKC β no era necessària per la fosforilació d'Akt en Ser473 en cèl·lules de LLC estimulades amb IgM or SDF-1 α (Figura C1.14).

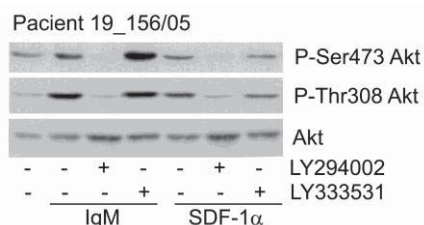


Figura C1.14. La inhibició de PKC β no bloqueja la fosforilació d'Akt induïda per l'activació del BCR i SDF-1 α . Cèl·lules criopreservades de LLC es van preincubar amb LY294002 20 μ M o LY333531 1 μ M durant 1 hora, abans del tractament amb SDF-1 α 50 ng/ml o anti- IgM F(ab') $_2$ humana procedent de cabra 10 μ g/ml durant 20 minuts més (n = 3). Les cèl·lules es van lisar i els extractes totals es van analitzar per Western blot tal i com s'ha descrit a "Pacients, materials i mètodes".

A continuació, vam estudiar l'efecte de la inhibició de PKC β en limfòcits sans. De manera similar a les cèl·lules de LLC, el tractament de limfòcits humans B i T de donants sans amb PMA va induir la fosforilació d'Akt en Ser473 i Thr308, i aquesta fosforilació va ser inhibida per LY333531 (Figura C1.15).

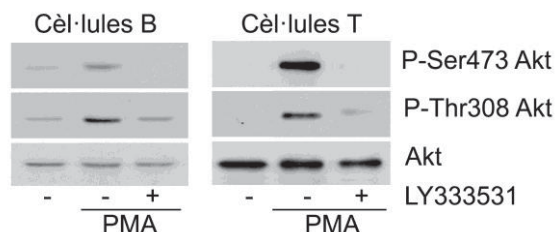


Figura C1.15. La inhibició de PKC β bloqueja la fosforilació d'Akt induïda pel PMA en limfòcits B i T de donants sans. Limfòcits B i T normals es van preincubar amb LY333531 1 μ M durant 1 hora abans del tractament amb PMA 10 nM durant 20 minuts (n = 2). Les cèl·lules es van lissar i els extractes totals es van analitzar per Western blot tal i com s'ha descrit a "Pacients, materials i mètodes".

Sorprenentment, LY333531 a 1 μ M, una dosi que va inhibir la fosforilació induïda per PMA no va afectar la viabilitat de les cèl·lules de LLC, ni tampoc va inhibir l'augment de viabilitat induït per PMA (Figura C1.16). Aquest resultat suggereix que altres isoformes de PKC participen en el manteniment de la viabilitat basal i induïda per PMA en les cèl·lules de LLC.

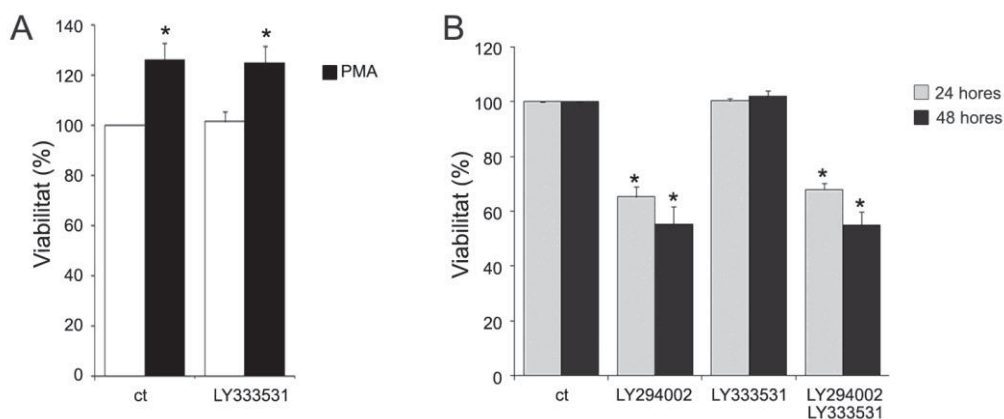


Figura C1. 16. Efecte de l'inhibidor LY333531 en les cèl·lules de LLC. (A) Les cèl·lules de LLC es van incubar durant 24 hores amb medi sol o amb LY333531 1 μ M, en combinació o no amb PMA 10 nM (barres negres) (n = 12). (B) Les cèl·lules de LLC es van incubar durant 24 hores (n = 9, barres grises) o 48 hores (n = 11, barres negres) amb LY294002 20 μ M, LY333531 10 μ M o la combinació de tots dos inhibidors. Es va mesurar la viabilitat per l'anàlisi de l'exposició de fosfatidilserina i captació d'IP, tal i com es descriu a Pacients, materials i mètodes. La viabilitat està expressada com el percentatge sobre la viabilitat de les cèl·lules sense tractar. Les dades es mostren com el valor de la mitjana \pm SEM. (A) *p<0.005 PMA versus control, PMA+LY333531 versus LY333531; (B) *p<0.001 cèl·lules tractades amb LY294002 versus control, LY294002+LY333531 versus control o LY333531.

Caracterització del perfil d'expressió d'ARNm de gens relacionat amb l'apoptosi.

Mentre estàvem realitzant aquest estudi, al nostre laboratori es va posar a punt la tècnica del RT-MLPA (*Retrotranscriptase Multiplex Ligation-Probe Amplification*) (Schouten *et al.*, 2002; Eldering *et al.*, 2003), descrita detalladament a "Pacients, materials i mètodes". El RT-MLPA ens permet l'anàlisi simultani del perfil d'expressió de 32 ARNm de gens relacionats amb l'apoptosi, en una mateixa mostra. D'aquesta manera vam voler aplicar la nova tècnica per estudiar de manera general els efectes de vies de supervivència PI3K dependents i PI3K independents en les cèl·lules de LLC.

Els resultats obtinguts per RT-MLPA es poden expressar de diferents maneres, però en gairebé totes les figures hem decidit mostrar l'expressió relativa dels ARNm, que dona idea de la quantitat relativa de cada missatger en la mostra. Una altra manera de representar les dades és en vegades d'inducció. Ens serveix per mostrar el nombre d'augmentos que han patit els missatgers després d'un determinat tractament. De manera general, els missatgers més abundants en les cèl·lules de LLC són *BMF*, *NOXA*, *BIM*, *BAX*, *BCL-2*, *MCL-1* i *HIAP1*, mentre que gairebé en cap pacient hem trobat expressió de *SURVIVIN*.

Per començar, vam estudiar l'efecte del inhibidor LY294002 en el perfil d'expressió de ARNm de gens relacionats amb apoptosi. El tractament de les cèl·lules de LLC amb LY294002 20 μ M durant 24 hores va induir un augment significatiu en els nivells d'ARNm de *BNIP3*, *BNIP3L*, *HRK*, *NOXA*, *BCL-X* i *SMAC* i una caiguda de *BCL-W*, *MCL-1*, *BFL-1* i *HIAP1* (Figura C1.17A, n = 9). *A priori* ens va semblar estrany que un inhibidor tan general com el LY294002 estigués afectant tants pocs missatgers, i vam comprovar amb la wortmanina que la inhibició de la via de PI3K només afectava aquests ARNm. Vam incubar les cèl·lules de LLC durant 24 hores amb wortmanina 100 nM o 1 μ M, i només vam observar una inducció en els nivells d'ARNm de *NOXA* i una caiguda en els nivells de *BCL-W*, mentre que no es va produir cap variació en els nivells de *HIAP1*. Tampoc vam observar una augment en *HRK* ni una caiguda de *MCL-1*, creiem que degut al pacient escollit per realitzar aquest experiment, ja que el tractament amb LY294002 tampoc va modificar els nivells d'aquests missatgers (Figura C1.17B). Aquests augments de gens proapoptòtics i caigudes del gens antiapoptòtics podrien explicar l'efecte apoptòtic del LY294002. Aquests resultats suggereixen que, sorprenentment, la inhibició de la via de PI3K té pocs efectes transcripcionals sobre gens relacionats amb l'apoptosi en les cèl·lules de LLC.

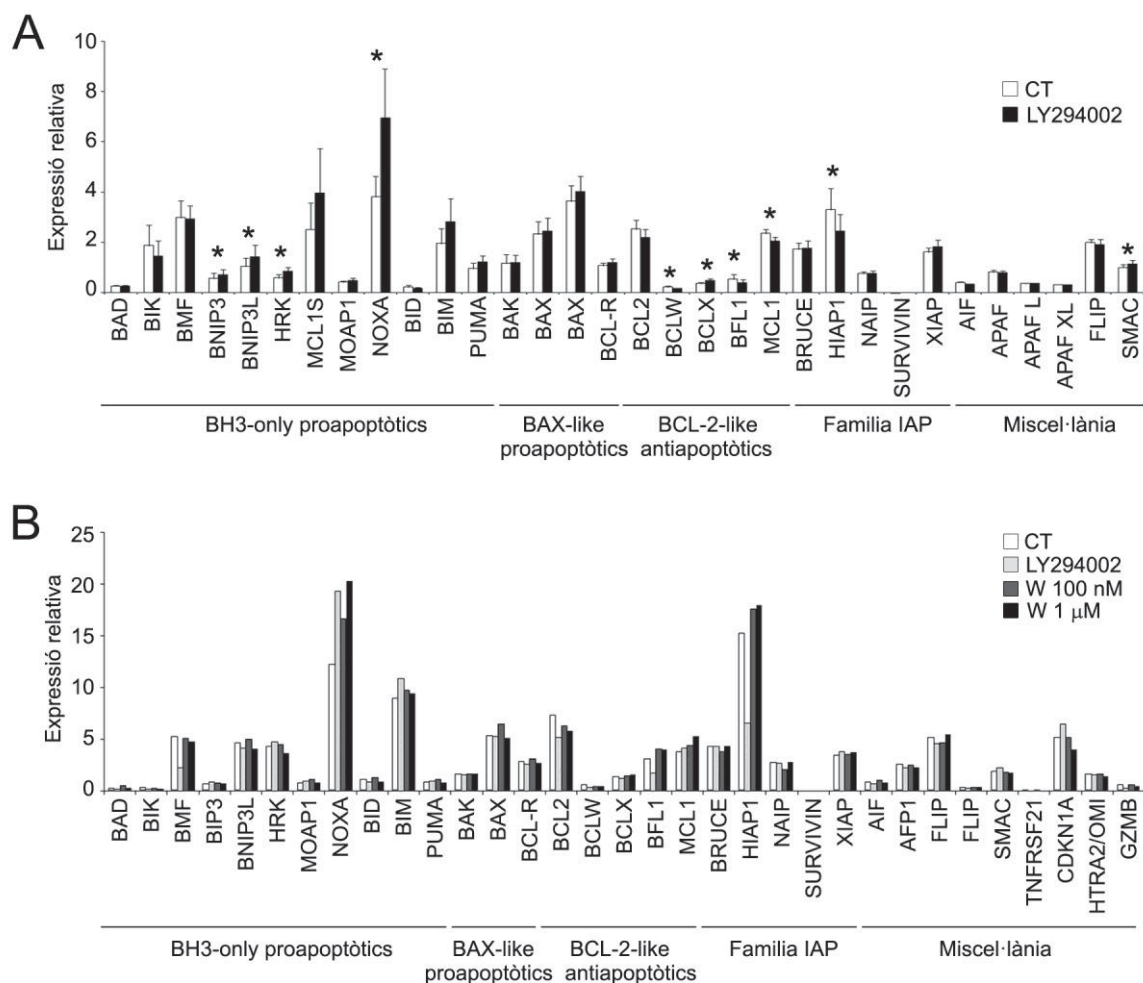


Figura C1.17. Perfil d'expressió de gens relacionats amb l'apoptosi amb inhibidors de PI3K. (A) Cèl·lules de LLC van ser no tractades (barres blanques) o tractades (barres negres) amb LY294002 20 μ M durant 24 hores ($n = 9$), o (B) cèl·lules de LLC van ser no tractades (barres blanques) o tractades (barres grises i negres) amb LY294002 20 μ M, wortmanina 100 nM i 1 μ M durant 24 hores ($n = 1$). Les cèl·lules es van lissar i el perfil d'expressió de gens relacionats amb l'apoptosi es va analitzar per RT-MLPA, tal i com es descriu a "Pacients, materials i mètodes". La suma de les dades de tots els pics es va fixar al 100% per normalitzar fluctuacions en la senyal total entre mostres, i els pics individuals es van calcular respecte al valor del 100%. Els resultats es mostren com el valor de la mitjana \pm SEM. * $p < 0.05$ cèl·lules tractades versus no tractades.

A continuació vam estudiar els efectes de la inhibició de la via de PKC en el perfil d'expressió d'ARNm. La incubació de les cèl·lules de LLC amb Bis I 5 μ M durant 24 hores va induir un increment en els nivells d'ARNm de *PUMA*, *BAK*, *BAX* i *XIAP*, i una disminució dels nivells d'ARNm de *BNIP3L*, *BCL-2* i *HIAP1* (Figura C1.18A, $n = 4$). També vam estudiar els efectes de la inhibició de PKC β : el tractament de les cèl·lules de LLC amb LY333531 10 μ M durant 24 hores no va induir cap efecte transcripcional (Figura C1.18B). Això encaixa amb que el LY333531 només afecta una isoforma de PKC, la PKC β , i no induïx apoptosi en les cèl·lules de LLC, i per tant no esperariem veure cap modificació en els nivells de missatger. En canvi, el

Bis I que inhibeix totes les isoformes de PKC clàssiques i noves, i que indueix apoptosi en les cèl·lules de LLC, si que indueix augments de gens proapoptòtics i caigudes del gens antiapoptòtics.

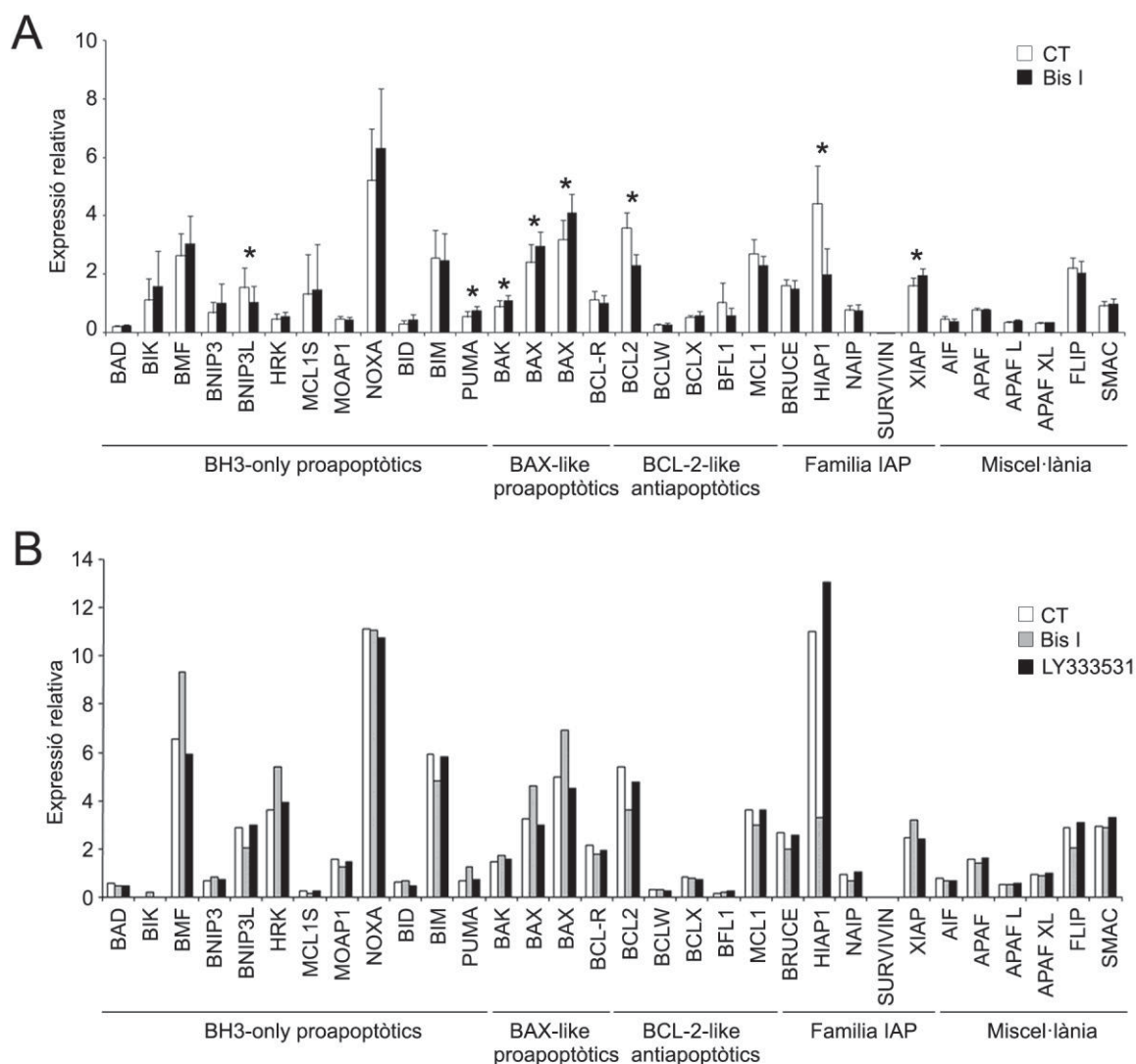


Figura C1.18. Perfil d'expressió de gens relacionats amb l'apoptosi amb inhibidors de PKC. (A) Cèl·lules de LLC van ser no tractades (barres blanques) o tractades (barres negres) amb Bis I 5 μ M durant 24 hores (n = 4), o (B) cèl·lules de LLC van ser no tractades (barres blanques) o tractades (barres grises i negres) amb Bis I 5 μ M o LY333531 10 μ M durant 24 hores (n = 1). Les cèl·lules es van lisar i el perfil d'expressió de gens relacionats amb l'apoptosi es va analitzar per RT-MLPA, tal i com es descriu a "Pacients, materials i mètodes". La suma de les dades de tots els pics es va fixar al 100% per normalitzar fluctuacions en la senyal total entre mostres, i els pics individuals es van calcular respecte al valor del 100%. Els resultats es mostren com el valor de la mitjana \pm SEM. *p<0.05 cèl·lules tractades versus no tractades.

A continuació vam voler estudiar els efectes del PMA a nivell transcripcional. El tractament de les cèl·lules de LLC amb PMA 10 nM durant 24 hores va induir un augment significatiu en pràcticament tots els missatgers (Figura C1.19A). En vegades d'inducció, els missatgers que

més van augmentar van ser *BFL-1* (30 vegades d'inducció respecte el control) i *MCL1s* (4.8 vegades d'inducció respecte el control) (Figura C1.19B, n = 9). L'augment de *BFL-1* es va donar en totes les mostres estudiades, en un rang de 4 a 52 vegades d'inducció. Vam intentar confirmar aquest augment de del missatger de *BFL-1* a nivell proteic, realitzant Western blot, però no vam aconseguir cap anticòs que funcionés. Així doncs, no podem confirmar que aquest augment d'ARNm també es dona a nivell proteic.

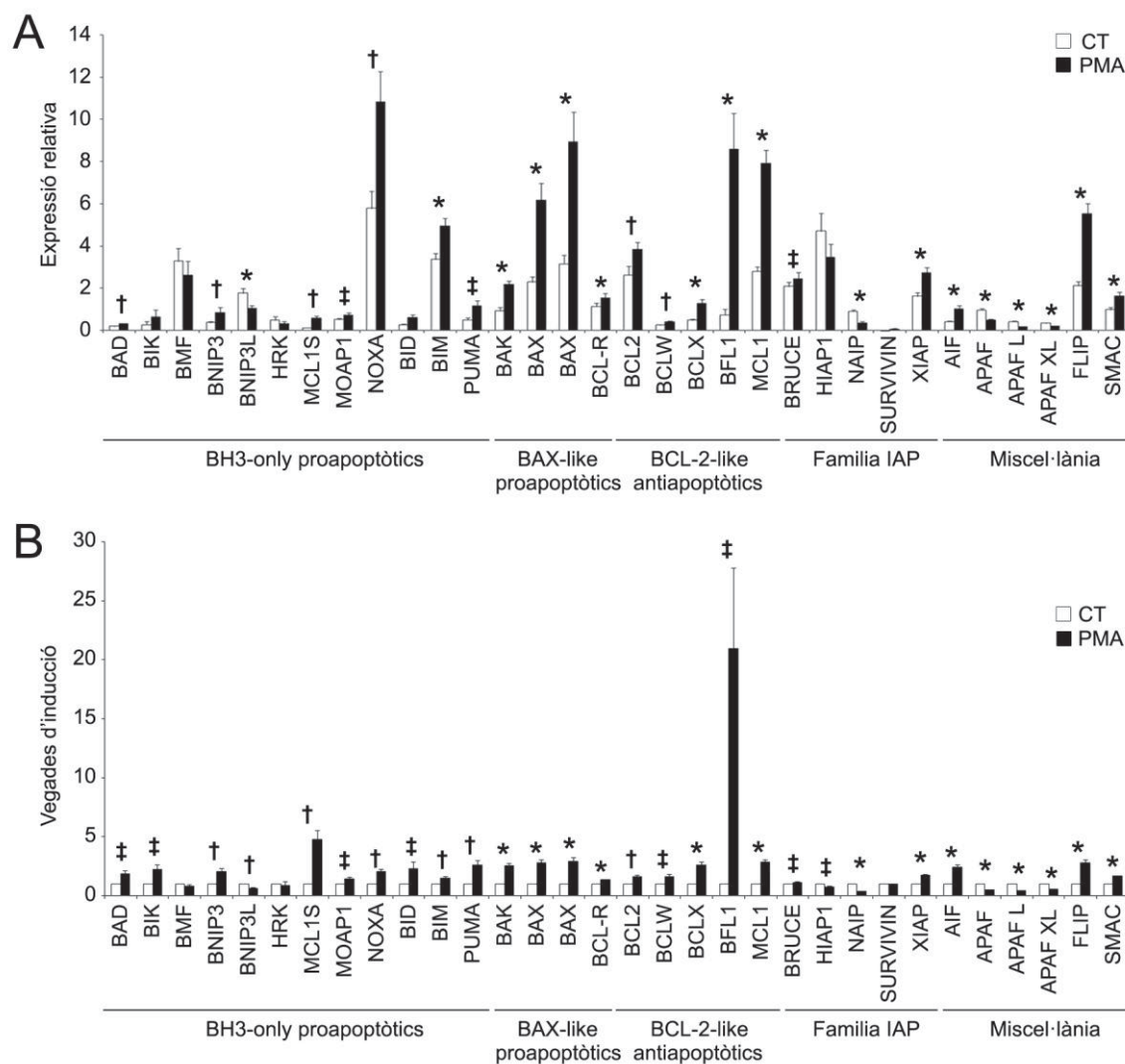


Figura C1.19. Perfil d'expressió de gens relacionats amb l'apoptosi amb PMA. Cèl·lules de LLC van ser no tractades (barres blanques) o tractades amb PMA 10 nM (barres negres) durant 24 hores (n = 9). Les cèl·lules es van lisar i el perfil d'expressió de gens relacionats amb l'apoptosi es va analitzar per RT-MLPA, tal i com es descriu a "Pacients, materials i mètodes". La suma de les dades de tots els pics es va fixar al 100% per normalitzar fluctuacions en la senyal total entre mostres, i els pics individuals es van calcular respecte al valor del 100%. Els resultats es mostren com el valor de la mitjana \pm SEM (A) i com les vegades d'inducció en relació a les cèl·lules no tractades (B), † $p < 0.05$, †† $p < 0.005$, * $p < 0.001$ cèl·lules tractades *versus* no tractades.

CAPÍTOL 2.
EFFECTE DELS INHIBIDORS D'AKT
EN LES CÈL·LULES DE LLC

Introducció.

Els inhibidors d'Akt, Akti-1/2 i A-443654.

Al nostre grup, la Dra. Montserrat Barragán va demostrar la implicació de la via de PI3K/Akt en la supervivència de les cèl·lules de LLC (Barragan *et al.*, 2002), i en el primer capítol d'aquesta memòria hem demostrat que les cèl·lules de LLC tenen Akt constitutivament activa, i que la inhibició de les vies que l'activen, com les vies de PI3K i PKC, indueix apoptosi. Mentre realitzàvem els experiments inclosos en el primer capítol, malauradament ens mancaven les eines necessàries per estudiar el paper concret d'Akt en la viabilitat de les cèl·lules de LLC.

Recentment s'han descrit els primers inhibidors potents i selectius per Akt, l'A-443654 i l'Akti-1/2. Tenint en compte tota la informació que teníem de la regulació d'Akt en les cèl·lules de LLC, i com ja s'ha detallat anteriorment, les cèl·lules de LLC no es poden transfectar, aquest dos inhibidors ens van semblar la millor eina disponible per acabar de descriure el paper d'Akt en la LLC. Així doncs, en aquest segon capítol hem estudiat l'efecte d'aquests dos inhibidors d'Akt en les cèl·lules de LLC.

Els laboratoris Abbott van descriure l'A-443654. És un inhibidor d'Akt potent, competitiu per l'ATP i que inhibeix reversiblement l'activitat fosforiladora catalitzada per Akt (Figura C2.1A). És un inhibidor d'Akt amb la mateixa potencia per les isoformes Akt1, Akt2 i Akt3 (Luo *et al.*, 2005; Shi *et al.*, 2005). S'ha descrit que junt amb la disminució de la fosforilació de les dianes d'Akt es produeix un augment concomitant en la fosforilació en els residus Ser473 i Thr308 d'Akt, anomenat hiperfosforilació (Okuzumi *et al.*, 2009). Aquest mecanisme d'acció ha estat estudiat (Han *et al.*, 2007; Okuzumi *et al.*, 2009), i s'ha descrit que l'A-443654 indueix la translocació d'Akt del citoplasma a la membrana citoplasmàtica. Es desconeix però, si aquesta hiperfosforilació es produeix perquè l'A-443654 indueix un canvi conformacional en Akt que facilita la seva fosforilació, o bé perquè aquest canvi conformacional la fa menys susceptible a la defosforilació per fosfatases. Aquesta hiperfosforilació és dependent de PI3K, ja que la incubació de les cèl·lules amb LY294002 la bloqueja (Han *et al.*, 2007). Posteriorment, es va descriure que l'inhibidor A-443654 inhibia altres quinases, com PKA, PRK2, MSK1 i DYRK1A (Bain *et al.*, 2007). En aquest article, també es descrivia un altre inhibidor d'Akt desenvolupat per Merck, molt més selectiu, l'Akti-1/2. L'Akti-1/2 és un inhibidor al·lostèric, no competitiu d'ATP, que bloqueja Akt1 i Akt2, però no Akt3. S'uneix a una interfase de interacció entre el domini quinasa i el domini PH a través del residu Trp80, bloquejant Akt en la seva conformació inactiva (Calleja *et al.*, 2009). Així doncs, el domini d'homologia de plecstrina és necessari per l'activitat d'aquest inhibidor (Barnett *et al.*, 2005; Logie *et al.*, 2007).

En aquest capítol hem examinat l'efecte d'aquests dos inhibidors d'Akt en les cèl·lules de LLC. Hem demostrat que tots dos indueixen apoptosi en les cèl·lules de LLC i modulen la família de proteïnes BCL-2, i això succeeix mitjançant diferents mecanismes.

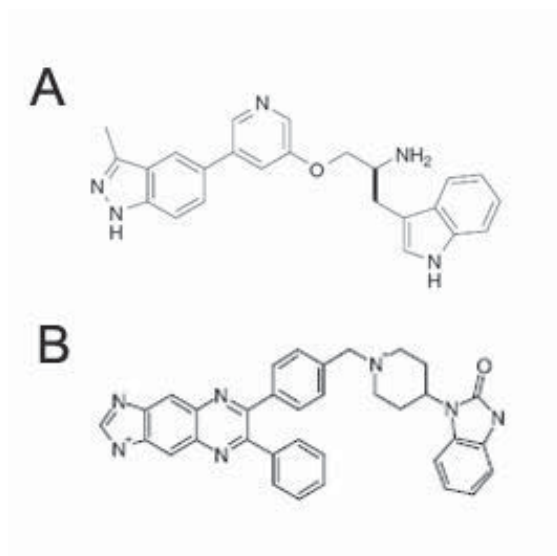


Figura C2.1. Estructures dels inhibidors A-443654 (A) i Akti-1/2 (B).

Resultats.

Akti-1/2 i A-443654 inhibeixen Akt en les cèl·lules de LLC.

Per comprovar que els inhibidors Akti-1/2 i A-443654 estaven actuant en les cèl·lules de LLC, vam examinar l'estat de fosforilació d'Akt en el residu Ser473 i vam mirar l'estat de fosforilació d'alguns dels seus substrats. Vam comprovar que Akti-1/2 inhibia la fosforilació d'Akt de manera dosi-dependent (Figura C2.2A, $n = 3$). Tal i com s'havia descrit en altres models cel·lulars (Luo *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2007), l'A-443654 va induir un augment en la fosforilació del residu Ser473, i per tant, aquesta mesura no ens servia per saber si aquest inhibidor estava bloquejant l'activitat d'Akt. Per comprovar-ho, vam analitzar la fosforilació de dos substrats d'Akt, GSK3 α/β i FoxO1/FoxO3a. Tots dos inhibidors van disminuir la fosforilació de GSK3 α/β i de FoxO1/FoxO3a (Figura C2.2B, s'ensenyen 4 mostres representatives de 9), demostrant que tots dos inhibidors estaven inhibint l'activitat d'Akt en les cèl·lules de LLC.

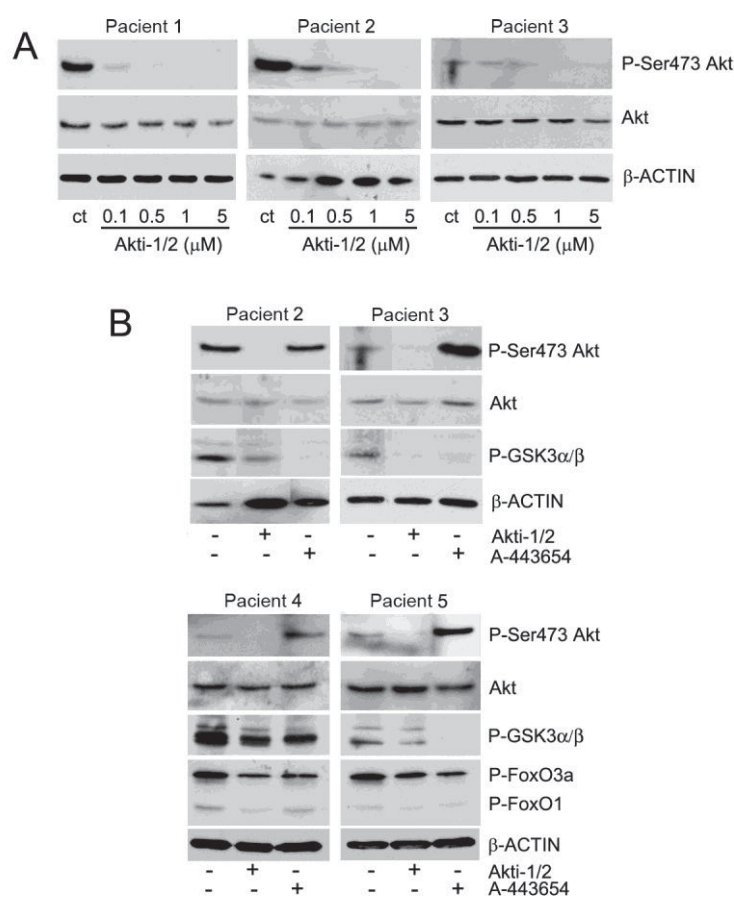


Figura C2.2. Efectes d'Akti-1/2 i A-443654 en la fosforilació d'Akt i dels seus substrats. (A) Les cèl·lules de LLC es van incubar amb un rang de dosis d'Akti-1/2 (de 0.1 a 5 μM) durant 2 hores. Les cèl·lules es van lissar i els extractes totals es van analitzar per Western blot tal i com s'ha descrit a "Pacients, materials i mètodes". Es mostren els resultats de tres pacients ($n = 3$). (B) Les cèl·lules de LLC es van incubar sense o amb Akti-1/2 5 μM i A-443654 0.5 μM (pacient 2, 4 i 5) o 1 μM (pacient 3) durant 2 hores. Les cèl·lules es van lissar i els extractes totals es van analitzar per Western blot tal i com s'ha descrit a "Pacients, materials i mètodes". Es mostra el resultat de quatre pacients representatius ($n = 9$).

Els inhibidors d'Akt indueixen apoptosi en les cèl·lules de LLC.

Per avaluar la capacitat d'induir apoptosi dels inhibidors d'Akt, vam incubar les cèl·lules de LLC amb un rang de concentracions d'Akti-1/2 (0.5-20 μ M) i A-443654 (0.1-1 μ M) i vam mesurar la viabilitat cel·lular per citometria de flux després de 24 hores de tractament. Tots dos inhibidors van induir apoptosi de manera dependent de dosi i de temps (Figura C2.3A i B). La concentració efectiva 50 (EC₅₀) va ser $9.85 \pm 0.67 \mu$ M per Akti-1/2 (n = 20) amb un rang de 5 a 15, i $0.63 \pm 0.03 \mu$ M per A-443654 (n = 26) amb un rang de 0.40 a 0.85. Vam obtenir resultats similars amb cèl·lules purificades CD19⁺ de LLC (Figura C2.3C).

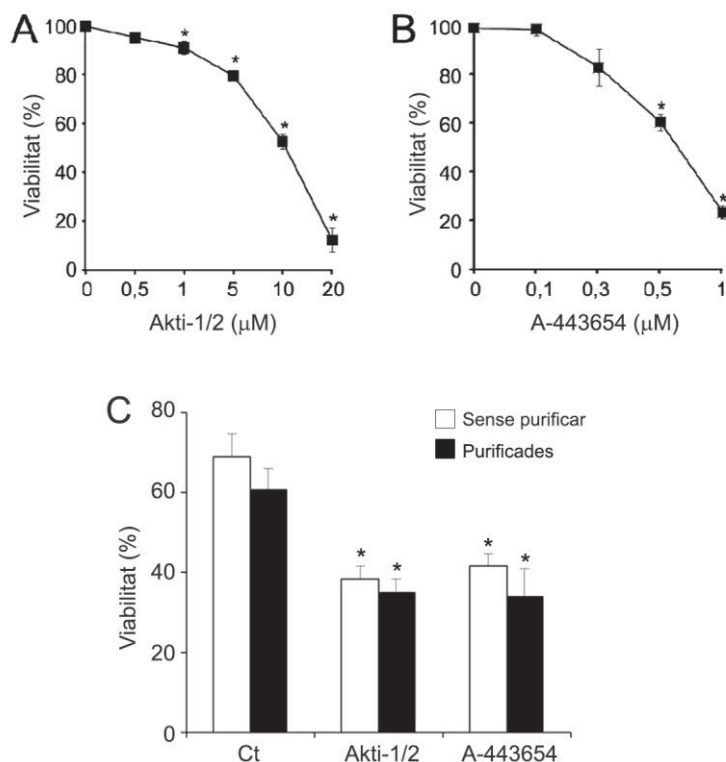


Figura C2.3. Efecte citotòxic dels inhibidors d'Akt en cèl·lules de LLC. Cèl·lules de LLC van ser incubades amb varies dosis d'Akti-1/2 (A, n = 15) i A-443654 (B, n = 15) durant 24 hores. La viabilitat està expressada com el percentatge sobre la viabilitat de les cèl·lules sense tractar. (C) Cèl·lules provinents de la mateixa mostra de LLC, abans (barres blanques) o després del procés de purificació de cèl·lules CD19⁺ (barres negres), es van incubar durant 24 hores sense (Ct) o amb Akti-1/2 5 μ M o A-443654 0.5 μ M (n = 3). Es va mesurar la viabilitat per l'anàlisi de l'exposició de fosfatidilserina i captació d'IP, tal i com es descriu a "Pacients, materials i mètodes". Les dades es mostren com el valor de la mitjana \pm SEM. (A, B) *p<0.005, cèl·lules tractades *versus* no tractades. (C) *p<0.05, cèl·lules tractades *versus* no tractades.

Tots dos inhibidors van induir apoptosi en totes les mostres analitzades, independentment del sexe, l'estat de ZAP70 i de CD38 (Figura C2.4A-D), o les alteracions genètiques. També vam estudiar si les cèl·lules fresques i criopreservades mostraven diferent sensibilitat al tractament amb els inhibidors d'Akt, tots dos inhibidors van induir apoptosi tant en mostres fresques com criopreservades, tot i que les fresques van resultar ser lleugerament més sensibles (Figura C2.4E).

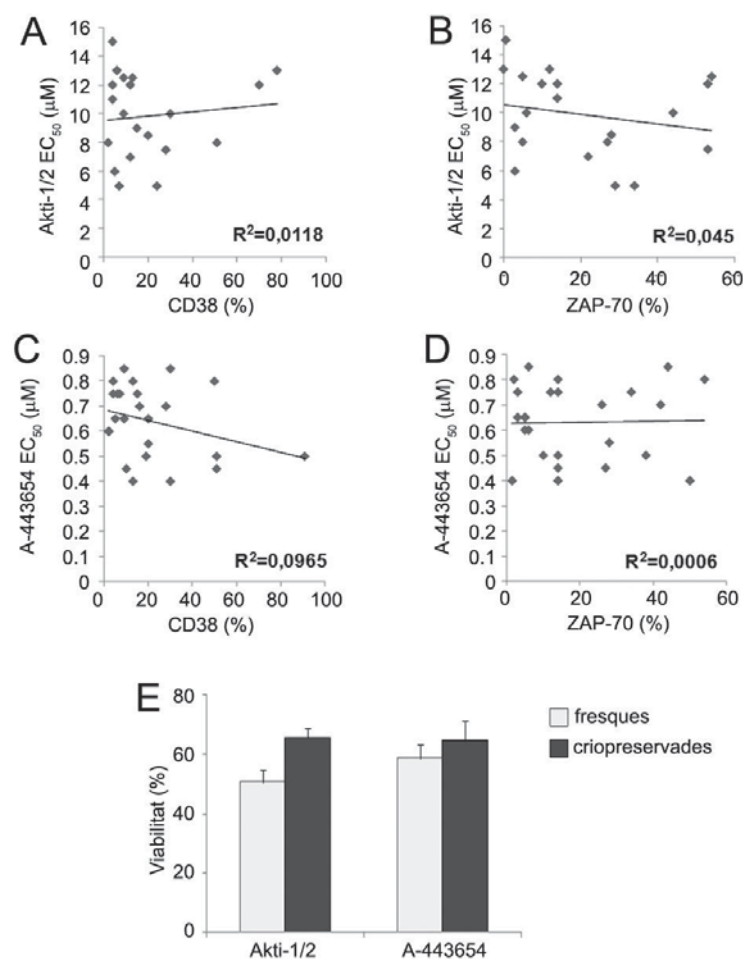


Figura C2.4. (A-D) Correlació entre la EC_{50} d'Akti-1/2 i A-443654 i l'estatus de CD38 i ZAP70. R^2 és el coeficient de correlació, que mostra el grau de correlació entre les dues variables. **(E) Efecte en la viabilitat cel·lular induït pels inhibidors en mostres fresques o criopreservades.** La viabilitat està expressada com el percentatge sobre la viabilitat de les cèl·lules sense tractar. Els resultats es mostren com el valor de la mitjana \pm SEM ($n = 4$).

Efecte diferencial dels inhibidors d'Akt en cèl·lules B i T de LLC i de donants sans.

Seguidament, vam analitzar la sensibilitat de les cèl·lules normals B i T a l'apoptosi induïda pels inhibidors d'Akt. El número de cèl·lules B (CD19⁺) i T (CD3⁺) apoptòtiques es va mesurar en mostres de LLC i en mostres de donants sans exposades a diferents dosis d'Akti-1/2 (fins a 10 μ M) i A-443654 (fins a 1 μ M) durant 24 hores. La incubació amb Akti-1/2 5 μ M va reduir el percentatge de cèl·lules de LLC viables a $64.64 \pm 6.12\%$ (n = 9). Contràriament, el percentatge de cèl·lules T viables de les mostres de LLC va ser $102.4 \pm 3.46\%$ (n = 9). D'aquests experiments destaca que les cèl·lules B i T provinents de donants sans van ser resistents a l'apoptosi induïda per Akti-1/2. Després de la incubació amb Akti-1/2 5 μ M el percentatge de cèl·lules B i T viables va ser de $91.6 \pm 2.1\%$ i $100.7 \pm 7.2\%$ respectivament (n = 3) (Figura C2.5A).

Es van obtenir resultats similars després del tractament amb l'inhibidor A-443654, però la diferència en la sensibilitat de les cèl·lules de LLC i les cèl·lules B i T de donants sans va ser menys pronunciada que en el cas del inhibidor Akti-1/2. La incubació amb A-443654 0.5 μ M va reduir el percentatge de cèl·lules de LLC viables a $64.2 \pm 4.9\%$ (n = 13). Contràriament, el percentatge de cèl·lules T viables va ser $91.3 \pm 3.7\%$ (n = 13). Les cèl·lules B i T provinents de donants sans van ser menys sensibles que les cèl·lules de LLC al tractament amb A-443654. Així, després de la incubació amb A-443654 0.5 μ M, el percentatge de cèl·lules B i T viables va ser $83.4 \pm 5.8\%$ i $87.1 \pm 5.9\%$, respectivament (n = 8) (Figura C2.5B). Es van obtenir resultats similars amb tots dos inhibidors en tractaments més llargs, de 48 hores (Figura C2.5C, D).

Vam confirmar aquesta inducció apoptosi diferencial entre cèl·lules de LLC i limfòcits normals utilitzant una altra tècnica per mesurar l'apoptosi: l'anàlisi del pic subdiploïd, característic de l'apoptosi. Vam observar que les cèl·lules de LLC eren més sensibles que les cèl·lules T i que les cèl·lules B normals a l'augment del pic subdiploïd (sub-G₀) induït pels inhibidors d'Akt (Figura C2.6).

Aquests resultats indiquen que les cèl·lules B de mostres de LLC són més sensibles que les cèl·lules B de donants sans i que les cèl·lules T a l'apoptosi induïda pels inhibidors d'Akt.

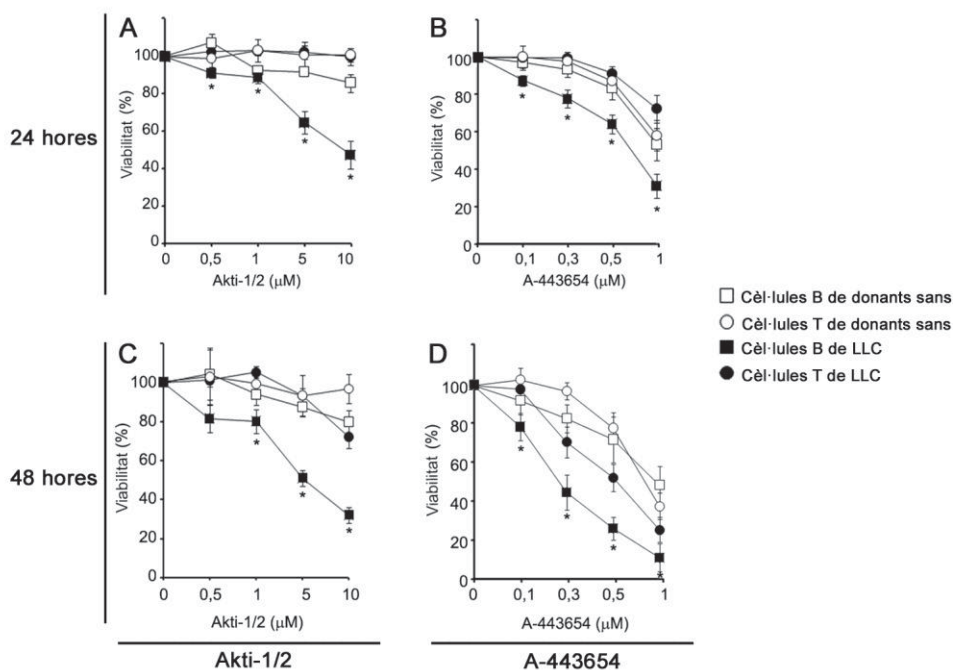


Figura C2.5. Efecte diferencial dels inhibidors d'Akt en cèl·lules B i T. Cèl·lules de LLC i de donants sans van ser incubades durant 24 (A, B) i 48 hores (C, D) sense o amb varies dosis d'Akti-1/2 (A i C, $n = 9$ i $n = 3$, respectivament) i A-443654 (B, $n = 13$ i $n = 8$, respectivament; D, $n = 11$ i $n = 5$, respectivament). La viabilitat es va mesurar com cèl·lules no apoptòtiques T $\text{CD3}^+/\text{CD19}^-$ de PBLs (○) i LLC (●) o cèl·lules no apoptòtiques B $\text{CD3}^+/\text{CD19}^+$ de PBLs (□) i LLC (■). La viabilitat està expressada com el percentatge sobre la viabilitat de les cèl·lules sense tractar. Els resultats es mostren com el valor de la mitjana \pm SEM. * $p < 0.005$, cèl·lules B versus cèl·lules T de LLC.

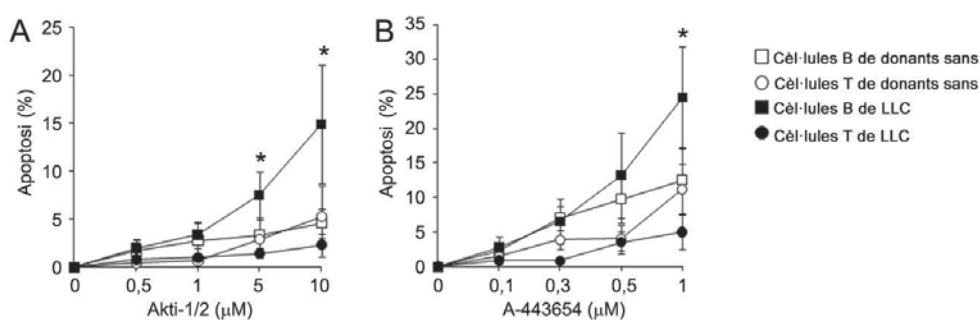


Figura C2.6. Efecte apoptòtic diferencial dels inhibidors d'Akt en cèl·lules B i T. Cèl·lules de LLC ($n = 6$) i de donants sans ($n = 4$) van ser incubades durant 24 hores amb varies dosis d'Akti-1/2 (A) i A-443654 (B). L'apoptosi es va mesurar com la quantificació del pic sub- G_0 de les cèl·lules T $\text{CD3}^+/\text{CD19}^-$ de PBLs (○) i CLL (●) o cèl·lules B $\text{CD3}^+/\text{CD19}^+$ de PBLs (□) i CLL (■) i està expressada com l'increment en el pic sub- G_0 respecte les cèl·lules sense tractar. Els resultats es mostren com el valor de la mitjana \pm SEM. * $p < 0.05$, cèl·lules B versus cèl·lules T de LLC.

Efecte dels factors de supervivència en combinació amb els inhibidors d'Akt.

Vam estudiar l'efecte de dos factors de supervivència ben coneguts per les cèl·lules de LLC, la interleuquina-4 (IL-4) (Dancescu *et al.*, 1992) i el SDF-1 α (*Stromal cell-derived factor-1 α*) (Burger *et al.*, 2000), en combinació amb els inhibidors d'Akt. Vam utilitzar pacients on aquests factors induïen un efecte de supervivència. Vam tractar les cèl·lules de LLC amb IL-4 10 ng/mL (Figura C2.7A, n = 10) i SDF-1 α 50 ng/mL (Figura C2.7B, n = 7) i amb o sense Akti-1/2 o 10 μ M A-443654 0.5 μ M durant 48 hores, i vam mesurar la viabilitat cel·lular. Ni la IL-4 ni el SDF-1 α van ser capaços d'inhibir l'apoptosi induïda pels dos inhibidors d'Akt. Aquests resultats mostren que els inhibidors d'Akt poden induir apoptosi inclús en presència de factors de supervivència.

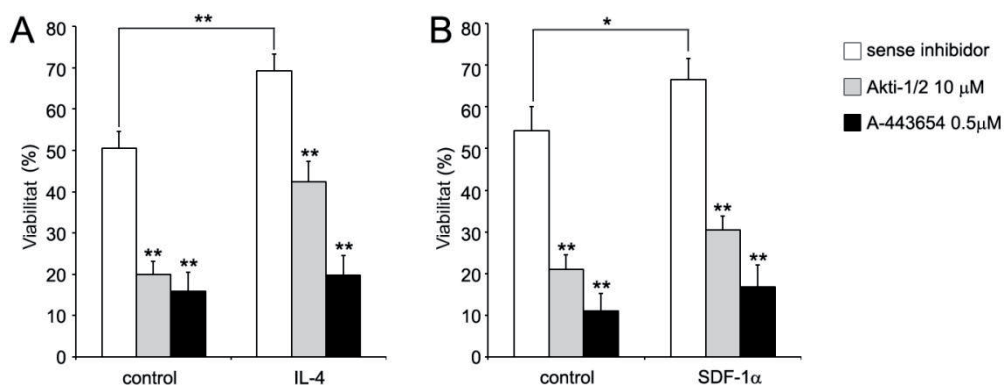


Figura C2.7. Efecte dels senyals de supervivència en l'activitat apoptòtica dels inhibidors d'Akt.

Cèl·lules de LLC van ser tractades amb IL-4 10 ng/mL (A, n = 10) o SDF-1 α 50 ng/mL (B, n = 7) sense (barres blanques) o amb Akti-1/2 10 μ M (barres grises) o A-443654 0.5 μ M (barres negres) durant 48 hores. Es va mesurar la viabilitat per l'anàlisi de l'exposició de fosfatidilserina i captació d'IP, tal i com es descriu a "Pacients, materials i mètodes", i està expressada com el percentatge sobre la viabilitat de les cèl·lules sense tractar. Les dades es mostren com el valor de la mitjana \pm SEM. **p<0.001, cèl·lules tractades amb IL-4 *versus* control i cèl·lules tractades amb els inhibidors d'Akt *versus* control; *p<0.01 cèl·lules tractades amb SDF-1 α *versus* control.

Caracterització de l'apoptosi induïda pels inhibidors d'Akt en cèl·lules de LLC.

Vam investigar l'efecte dels inhibidors d'Akt en el perfil d'expressió d'ARN missatger (ARNm) de gens relacionats amb apoptosi, mitjançant la tècnica de RT-MLPA (descrita detalladament a "Pacients, materials i mètodes").

En aquesta ocasió ens vam trobar amb una dificultat en l'elecció del gen normalitzador. Normalment és acceptat que els nivells d'ARNm del gen *β-gluconidasa* (*GUS*) no s'alteren en les condicions d'experimentació i s'utilitza com a normalitzador en cèl·lules hematològiques (Loseke *et al.*, 2003, Tesi doctoral Dr. Llorenç Coll-Mulet, 2007). Però en el nostre cas, *GUS* i la resta de normalitzadors del *kit* del RT-MLPA (*β*-2-microglobulina, ferritina, serpina, i poli(A)-*specific ribonuclease*) es modulaven en el tractament amb A-443654 (Figura C2.8). Per això en aquest capítol hem representat les dades crues, sense normalitzar, tot i que existeix la possibilitat que *GUS* segueixi sent un bon normalitzador i la seva caiguda estigui reflectint una caiguda general de la transcripció.

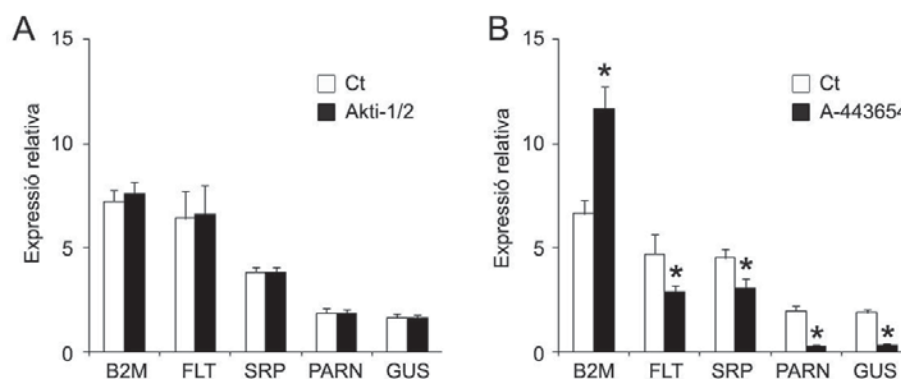


Figura C2.8. Modulació dels normalitzadors del RT-MLPA amb Akti-1/2 i A-443654. Cèl·lules de LLC van ser no tractades (barres blanques) o tractades (barres negres) amb Akti-1/2 5 μM (A) o A-443654 0.5 μM (B) durant 24 hores. Les cèl·lules es van lissar i el perfil d'expressió dels normalitzadors del RT-MLPA es va analitzar, tal i com es descriu a "Pacients, materials i mètodes". La suma de les dades de tots els pics es va fixar al 100% per normalitzar fluctuacions en la senyal total entre mostres, i els pics individuals es van calcular respecte al valor del 100%. Els resultats es mostren com el valor de la mitjana ± SEM de 4 i 8 experiments diferents per Akti-1/2 i A-443654, respectivament. **p* < 0.05 cèl·lules tractades *versus* no tractades (B2M, *β*-2-microglobulina; FLT, ferritina; SRP, serpina; PARN, poli(A)-*specific ribonuclease*; GUS, *β*-gluconidasa).

El tractament de les cèl·lules de LLC amb Akti-1/2 5 μM durant 24 hores no va induir cap canvi significatiu en el perfil de RT-MLPA. (Figura C2.9A, *n* = 4). Aquests resultats indiquen que la inhibició d'Akt té efectes mínims en el perfil d'expressió de gens relacionats amb l'apoptosi. Sorprenentment, la incubació de les cèl·lules de LLC amb A-443654 0.5 μM durant 24 hores va induir un increment en els nivells d'ARNm de *NOXA* i *PUMA* i una disminució dels nivells d'ARNm de *BMF*, *BID*, *BAX*, *BCL-W*, *NAIP*, *AIF*, *APAF* i *APAF_L* (Figura C2.9B, *n* = 8). Així, els canvis en els nivells d'ARNm que va induir l'A-443654 semblen independents de la seva activitat inhibint Akt, ja que Akti-1/2 no indueix cap canvi.

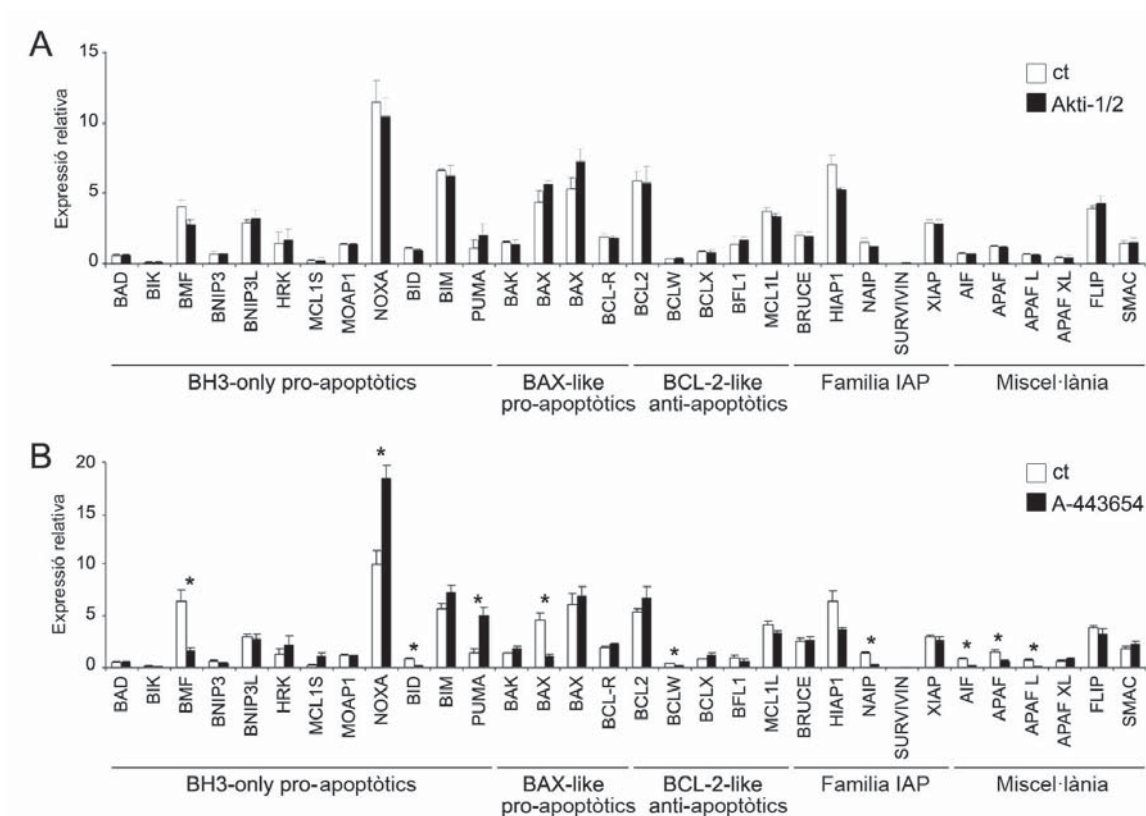


Figura C2.9. Perfil d'expressió de gens relacionats amb l'apoptosi. Cèl·lules de LLC van ser no tractades (barres blanques) o tractades (barres negres) amb Akti-1/2 5 μ M (A) o A-443654 0.5 μ M (B) durant 24 hores. Les cèl·lules es van lisar i el perfil d'expressió de gens relacionats amb l'apoptosi es va analitzar per RT-MLPA, tal i com es descriu a "Pacients, materials i mètodes". La suma de les dades de tots els pics es va fixar al 100% per normalitzar fluctuacions en la senyal total entre mostres, i els pics individuals es van calcular respecte al valor del 100%. Els resultats es mostren com el valor de la mitjana \pm SEM de 4 i 8 experiments diferents per Akti-1/2 i A-443654, respectivament. * $p < 0.005$ cèl·lules tractades versus no tractades.

Per tal de comprovar que els canvis que veiem en el perfil d'expressió de gens relacionats amb l'apoptosi eren degut a canvis en les cèl·lules de LLC i no a canvis en les cèl·lules contaminants (cèl·lules T i monòcits que no s'eliminen amb la purificació pel gradient de Ficoll), vam estudiar els efectes dels inhibidors d'Akt en cèl·lules B CD19⁺ de LLC, purificades amb el *kit* RosetteSep[®] (mètode de purificació descrit detalladament a "Pacients, materials i mètodes"), i amb una puresa superior al 96% en cèl·lules CD19⁺. Vam tractar aquestes cèl·lules amb Akti-1/2 5 μ M i A-443654 0.5 μ M durant 24 hores, i vam estudiar el perfil d'expressió de missatgers per RT-MLPA. Vam observar els mateixos canvis transcripcionals que en les cèl·lules de LLC purificades amb Ficoll (Figura C2.10). Així vam corroborar que els canvis observats per RT-MLPA es devien a les cèl·lules de LLC, i no a la presència en les mostres d'altres tipus cel·lulars.

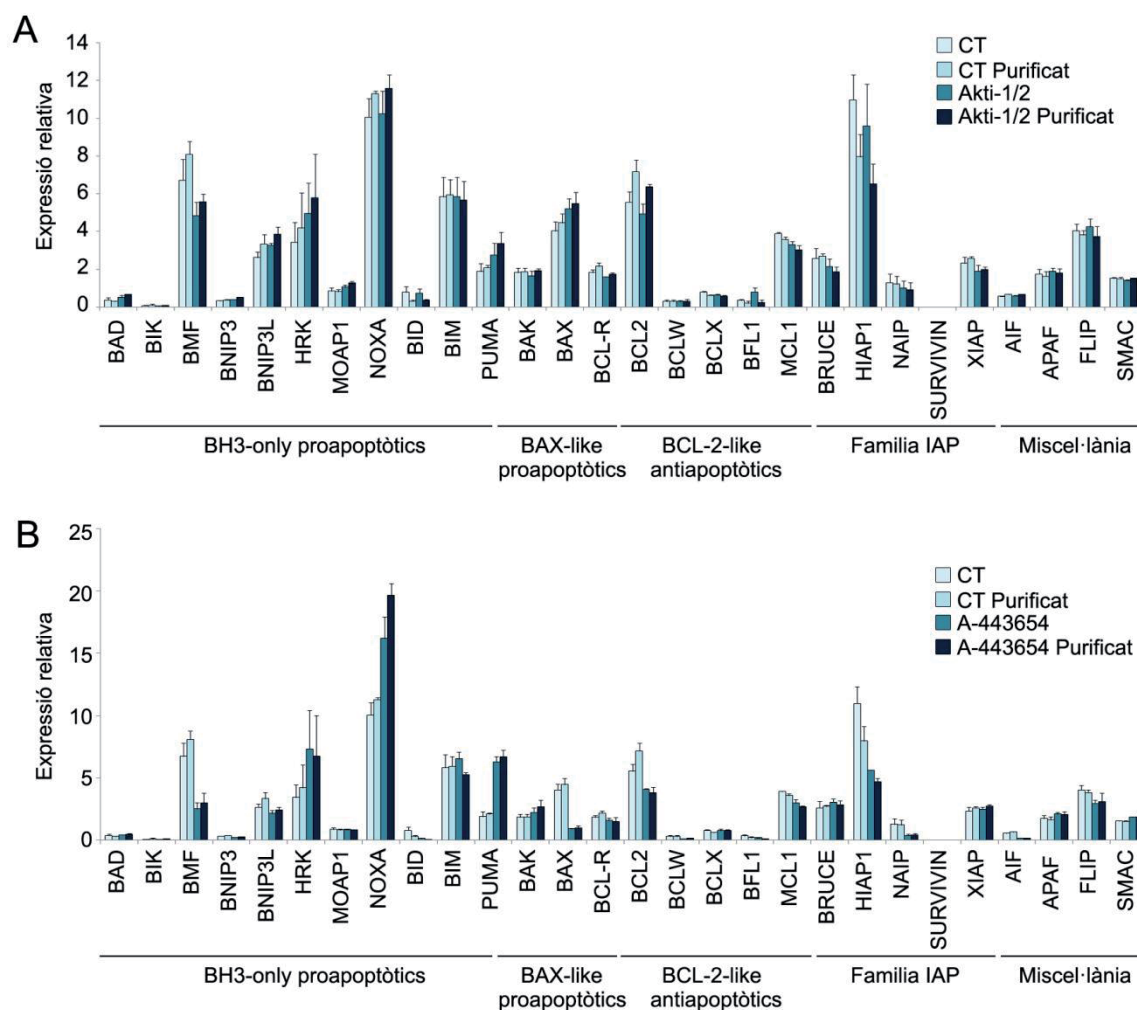


Figura C2.10. Perfil d'expressió de gens relacionats amb l'apoptosi en cèl·lules purificades i sense purificar. Cèl·lules provinents de la mateixa mostra de LLC, abans o després del procés de purificació de cèl·lules CD19⁺ (Purificades), es van incubar durant 24 hores sense (CT) o amb Akti-1/2 5 μ M (A) o A-443654 0.5 μ M (B) durant 24 hores. Les cèl·lules es van lisar i el perfil d'expressió de gens relacionats amb l'apoptosi es va analitzar per RT-MLPA, tal i com es descriu a "Pacients, materials i mètodes". La suma de les dades de tots els pics es va fixar al 100% per normalitzar fluctuacions en la senyal total entre mostres, i els pics individuals es van calcular respecte al valor del 100%. Els resultats es mostren com el valor de la mitjana \pm SEM de 3 experiments diferents.

Després d'aquesta primera aproximació utilitzant el RT-MLPA, vam analitzar l'efecte dels inhibidors d'Akt sobre l'expressió de les proteïnes de la família de BCL-2. L'anàlisi per Western blot va revelar una inducció de NOXA i una caiguda de MCL-1 induïts per Akti-1/2 i A-443654 en totes les mostres analitzades. Els nivells de PUMA van augmentar en la mitat de les mostres analitzades després del tractament amb els inhibidors d'Akt (Figura C2.11, es mostren tres pacients representatius, n = 10 per Akti-1/2 i n = 13 per A-443654). A més, el tractament amb A-443654 però no amb Akti-1/2 va augmentar la proteïna p53 en totes les mostres analitzades.

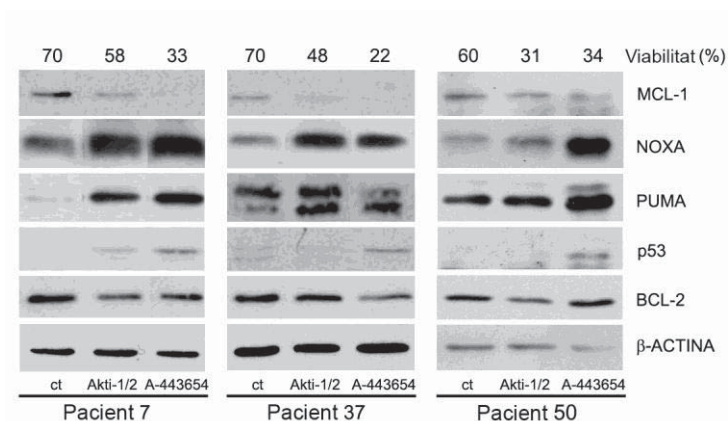


Figura C2.11. Perfil d'expressió de proteïnes relacionades amb l'apoptosi induït per Akti-1/2 i A-443654. Les cèl·lules no es van tractar (ct) o van ser tractades amb Akti-1/2 5 μM (n = 10) i A-443654 0.5 μM (n = 13) durant 24 hores, i es va determinar l'expressió de MCL-1, NOXA, PUMA, p53 i BCL-2 per Western blot. La viabilitat cel·lular s'expressa a la part superior de la figura. Es va utilitzar β-ACTINA per normalitzar els nivells de proteïna. Es mostren tres pacients representatius, dos corresponen a cèl·lules aïllades mitjançant un gradient de Ficoll (pacient 7 i 37), i l'altre correspon a cèl·lules purificades CD19⁺ de LLC (pacient 50).

A continuació, vam analitzar una mica més el perfil d'expressió de proteïnes relacionades amb l'apoptosi induït per Akti-1/2 i per A-443654 a diferents temps. No vam observar cap canvi en MCL-1, NOXA i PUMA després de 3 hores de tractament amb els inhibidors d'Akt. NOXA va augmentar després de 6 hores de tractament amb els inhibidors d'Akt, mentre que els nivells de PUMA van augmentar després de 12 hores de tractament. A més, els nivells de MCL-1 van disminuir després de 6 hores d'incubació amb A-443654 (Figura C2.12A, es mostren dos pacients representatius, n = 3). També vam estudiar quins canvis es produïen a aquests temps a nivell transcripcional. Així, vam incubar les cèl·lules de LLC amb Akti-1/2 5 μM o A-443654 0.5 μM i vam realitzar RT-MLPA a 6, 12 i 24 hores. L'Akti-1/2 no va induir cap canvi significatiu a cap dels temps estudiats, confirmant les dades que havíem obtingut a 24 hores. El tractament amb A-443654 va induir *NOXA*, i els augments més grans en aquest gen es van donar als temps primerencs (6 i 12 hores), mentre que l'augment de *PUMA* es va donar a les 12 hore i més clarament a les 24 hores. Les caigudes de *BMF*, *BID*, *BAX*, *BCL-W*, *NAIP*, *AIF*, *APAF* i *APAF_L* es van donar a tots els temps estudiats (Figura C2.12B i 12C).

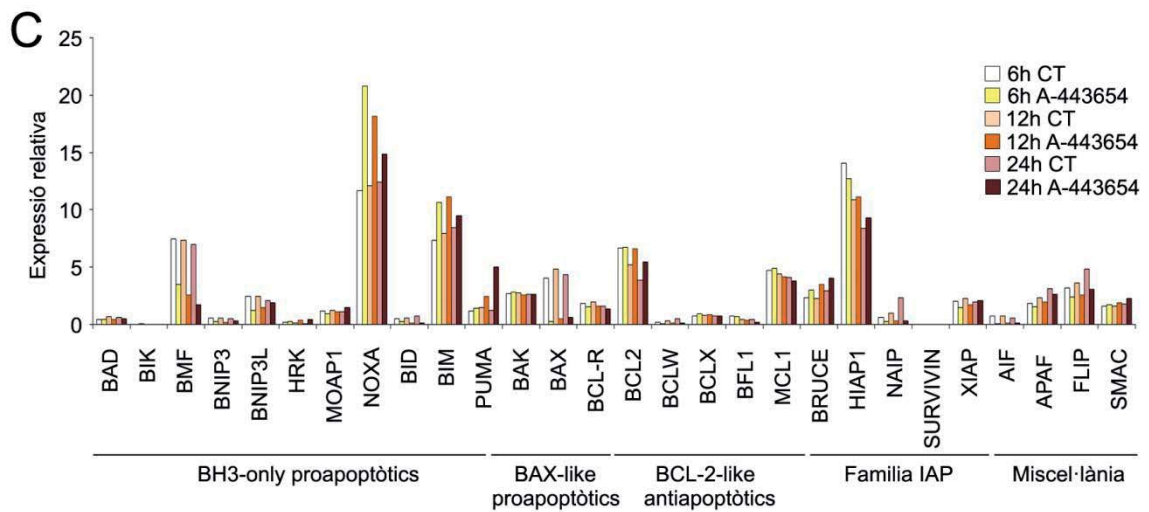
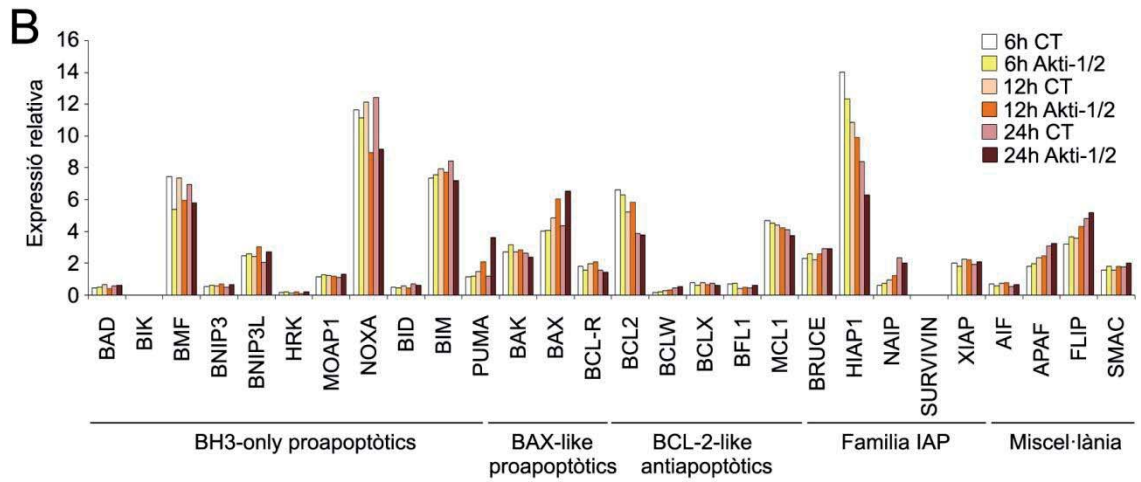
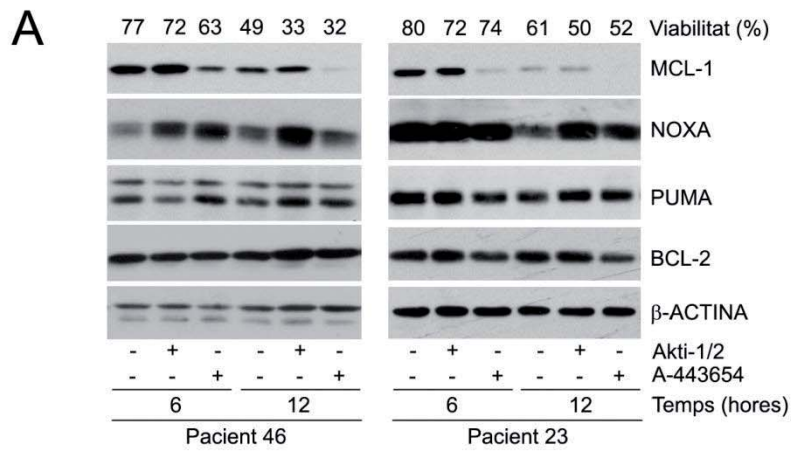


Figura C2.12 (llegenda a la pàgina següent).

Figura C2.12. Perfil d'apoptosi induït per Akti-1/2 i A-443654 a temps curts (6 i 12 hores). (A) Les cèl·lules no es van tractar (-) o van ser tractades amb Akti-1/2 5 μ M i A-443654 0.5 μ M durant 6 i 12 hores, i l'expressió de MCL-1, NOXA, PUMA, i BCL-2 es va determinar per Western blot. Es va utilitzar β -ACTINA per normalitzar els nivells de proteïna. Es mostren dos pacients representatius (n = 3). La viabilitat cel·lular s'expressa a la part superior de la figura. (B i C) Cèl·lules d'una mostra de LLC van ser tractades amb Akti-1/2 5 μ M (B) i A-443654 0.5 μ M (C) durant 6, 12 i 24 hores. Les cèl·lules es van lisar i el perfil d'expressió de gens relacionats amb l'apoptosi es va analitzar per RT-MLPA, tal i com es descriu a "Pacients, materials i mètodes". La suma de les dades de tots els pics es va fixar al 100% per normalitzar fluctuacions en la senyal total entre mostres, i els pics individuals es van calcular respecte al valor del 100%.

Finalment, vam estudiar una mica més la caiguda de MCL-1 induïda per tots dos inhibidors. El pretractament amb Z-VAD.fmk 200 μ M, un inhibidor de caspases, durant 30 minuts va bloquejar la caiguda de MCL-1 a 24 hores induïda per Akti-1/2, però no va bloquejar la caiguda induïda per A-443654 (Figura C2.13, n = 3). Aquest resultat demostra que la caiguda de MCL-1 induïda per Akti-1/2 és dependent de caspases, mentre que la caiguda induïda per A-44365 és independent de caspases i precedeix l'activació d'aquestes.

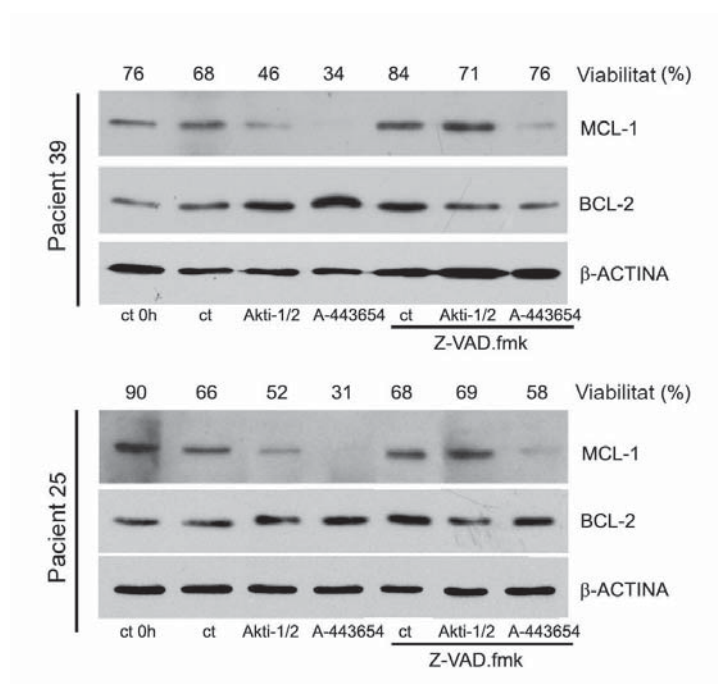


Figura C2.13. Efecte de Z-VAD.fmk en la caiguda de MCL-1 induïda per Akti-1/2 i A-443654. Les cèl·lules van ser pretractades sense o amb Z-VAD.fmk 200 μ M durant 30 minuts i a continuació van ser incubades amb Akti-1/2 5 μ M i A-443654 0.5 μ M durant 24 hores (es mostren dos pacients representatius, n = 3), i els nivells de MCL-1 van ser determinats per Western blot. BCL-2 i β -ACTINA es van utilitzar per normalitzar els nivells de proteïna. La viabilitat cel·lular s'expressa a la part superior de la figura.

Akti-1/2 i A-443654 induïen apoptosi independentment del estat de TP53 en les cèl·lules de LLC.

Per estudiar el paper de p53 en l'apoptosi induïda per Akti-1/2 i A-443654 vam analitzar l'efecte d'aquest compostos en mostres de pacients de LLC amb TP53 delecionat o mutat. Alguns d'aquests pacients ja havien estat descrits en diferents articles del grup (Coll-Mulet *et al.*, 2006; Santidrian *et al.*, 2007; Coll-Mulet *et al.*, 2008).

El pacient 8 té una deleció d'un al·lel de 17p en el 43% de cèl·lules PBLs, el pacient 41 té una deleció en un al·lel 17p en el 94% de cèl·lules de PBLs i el pacient 40 té una mutació amb canvi de pauta de lectura (*frame-shift*) en un al·lel (deleció d'un nucleòtid al codó 272) i una deleció 17p en l'altre al·lel en el 86% de cèl·lules de PBLs.

En primer lloc, vam incubar les cèl·lules de LLC amb Akti-1/2 5 μ M o A-443654 0.5 μ M durant 24 hores. Vam observar una disminució de la viabilitat en dues de les tres mostres testades amb el tractament d'Akti-1/2, mentre que l'inhibidor A-443654 va induir una pèrdua de la viabilitat en totes tres mostres (Figura C2.14A). L'anàlisi per Western blot va revelar un augment en els nivells de NOXA en les tres mostres amb el tractament amb tots dos inhibidors, mentre que l'augment de PUMA només el vam observar en una mostra després del tractament amb Akti-1/2 (pacient 8). Els nivells de MCL-1 van disminuir en les mostres dels pacients 8 i 41 amb Akti-1/2, els pacients on aquest inhibidor va induir apoptosi. En el pacient 40, els nivells de MCL-1 van augmentar amb Akti-1/2, i aquest no va induir apoptosi. El tractament amb A-443654 va induir una disminució en els nivells de MCL-1 en totes tres mostres analitzades (Figura C2.14A). Com a control de l'estat de TP53 vam utilitzar 5 μ M Nutlina-3a, una molècula de la que s'ha descrit que induïx apoptosi i acumulació de p53 en cèl·lules amb TP53 salvatge, però no en les TP53 mutades/delecionades (Coll-Mulet *et al.*, 2006). A continuació, vam examinar el perfil d'expressió d'ARNm de gens relacionats amb apoptosi per RT-MLPA. La incubació amb Akti-1/2 5 μ M o A-443654 0.5 μ M va induir el mateix perfil d'expressió d'ARNm que en les cèl·lules de LLC amb TP53 salvatge, amb l'excepció de l'ARNm de PUMA, que no va augmentar després del tractament amb A-443654 (Figura C2.14B).

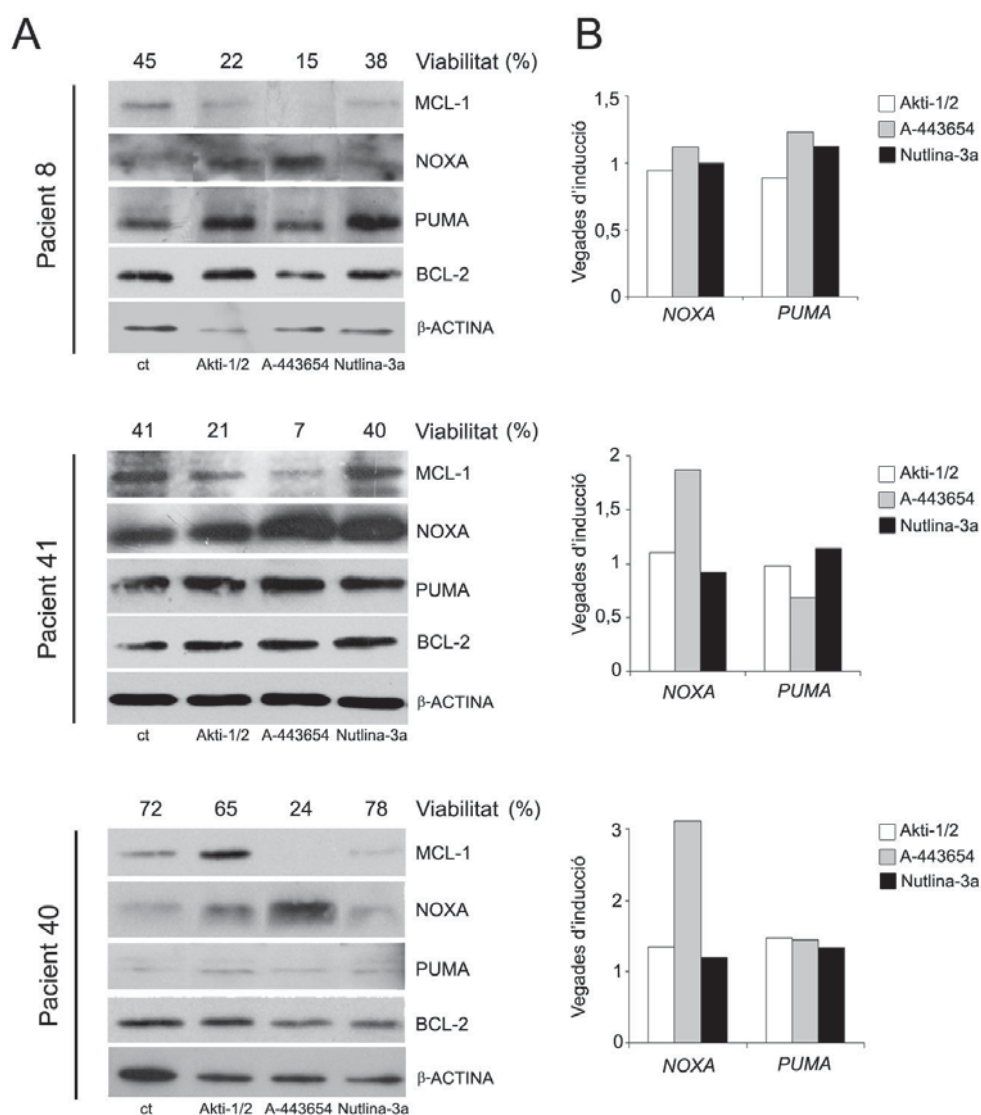


Figura C2.14. Perfil d'apoptosi induït per Akti-1/2 i A-443654 en mostres amb TP53 deletat/mutat. (A) Perfil d'expressió proteic i efecte citotòxic de Akti-1/2, A-443654 i Nutlina-3a. Les cèl·lules no es van tractar (ct) o van ser tractades amb Akti-1/2 5 µM, A-443654 0.5 µM o Nutlina-3a 5 µM durant 24 hores, i l'expressió de MCL-1, NOXA, PUMA i BCL-2 es va determinar per Western blot. Es va utilitzar β-ACTINA per normalitzar els nivells de proteïna. Es va mesurar la viabilitat per l'anàlisi de l'exposició de fosfatidilserina i captació d'IP, tal i com es descriu a "Pacients, materials i mètodes", i s'expressa a la part superior de la figura. (B) Perfil d'expressió de gens relacionats amb l'apoptosi induïts per Akti-1/2 i A-443654 en mostres de LLC amb TP53 deletat/mutat. Les cèl·lules no es van tractar o van ser tractades amb Akti-1/2 5 µM (barres blanques) o A-443654 0.5 µM (barres grises) o Nutlina-3a 5 µM (barres negres) durant 24 hores. Les cèl·lules es van lisar i el perfil d'expressió de gens relacionats amb l'apoptosi es va analitzar per RT-MLPA, tal i com es descriu a "Pacients, materials i mètodes". La suma de les dades de tots els pics es va fixar al 100% per normalitzar fluctuacions en la senyal total entre mostres, i els pics individuals es van calcular respecte al valor del 100%. Els resultants s'expressen com vegades d'inducció respecte els valors basals (sense tractament) de cadascun dels gens representats.

TAULA DE PACIENTS DEL CAPÍTOL 2

Pacient	Número ID	Edat/Sexe	Leucòcits (10 ⁹ /L)	Limfòcits (%)	CD19+ (%)	CD38+ (%)	ZAP70+ (%)	Alteracions genòmiques	F/C	EC ₅₀ (μM) Akti-1/2	EC ₅₀ (μM) A-443654
1	57	75/F	41	78	77	2	ND	ND	F		
2	154	63/F	71	84	72	28	53	ND	F	7.5	
3	414	64/F	100	76	96	87	40	del 13q, del 17p	C		
4	34	72/M	49	96	84	2	0,56	del 13q	F		
5	542	76/F	27	84	75	15	3	ND	F	9	0.75
6	108	71/M	94	94	88	16	26	normal	F		0.7
7	499	61/M	76	84	82	2	6	ND	F		0.6
8	537	70/M	98	94	86	2	5	del 17p	F	8	0.6
9	186	77/F	137	68	90	10	14	normal	F		0.45
10	69	73/F	82	88	80	20	5	ND	F		0.65
11	198	74/F	31	93	89	ND	14	ND	F		0.4
12	52-404	65/M	16	93	83	91	38	normal	F		0.5
13	684	57/M	31	84	79	50	2	del 11q	F		0.8
14	462	61/F	90	96	80	9	5	normal	C	12.5	0.65
15	509	50/M	60	94	80	30	6	del 13q	C	10	0.85
16	32	71/F	77	84	86	6	12	normal	C	13	0.75
17	379	66/F	91	95	73	20	28	del 13q	F	8.5	0.55
18	160	66/F	44	86	80	4	14	ND	C	11	0.75
19	409	81/F	76	92	85	51	27	ND	C	8	0.45
20	252	70/M	58	94	70	12	10	del 13q	F	12	
21	257	82/M	67	80	80	78	0,05	ND	F	13	
22	511	75/F	93	84	90	4	0,64	del 13q	F	15	
23	615	85/F	100	80	80	12	22	del 13q	F	7	
24	424	63/F	56	91	83	13	1,5	normal	C		0.4
25	165	75/M	83	89	82	35	15	del 13q	F		
26	320	53/M	113	94	94	51	10	del 13q	C		0.5
27	188	59/F	89	90	80	7	34	normal	F	5	0.75
28	76	81/F	22	92	72	5	3	ND	F	6	0.65
29	672	86/M	22	89	71	28	42	ND	F		0.7
30	127	69/M	53	87	74	ND	ND	del 13q	C		0.5
31	156	56/M	55	95	72	70	53	del 13q, del 11q	C	12	
32	219	54/M	30	73	48	13	54	ND	C	12.5	0.8
33	209	71/F	54	74	80	9	44	del 13q	C	10	0.85
34	370	81/F	31	83	79	7	7	normal	C		
35	577	72/M	37	86	74	2	1	normal	F		
36	613	74/M	590	97	ND	24	52	tris 12	C		
37	75	85/M	31	87	80	30	50	ND	F		0.4
38	152	71/M	48	87	87	18	4	normal	F		
39	83	54/M	132	93	88	19	14	normal	C		0.5
40	27	70/M	131	98	86	93	39	del 17p, del 11q	C		
41	87	73/F	18	86	ND	24	29	del 17p	C	5	
42	564	81/M	24	95	85	60	31	tris 12, del 11q	C		
43	60	66/F	44	86	80	4	14	ND	C	12	0.8
44	540	80/M	96	93	80	2	0,48	del 13q, del 11q	C		
45	475	74/F	43	94	87	10	8	del 13q	C		
46	445	58/M	74	89	90	24	6	del 13q	C		
47	444	70/M	79	84	91	ND	ND	del 13q	C		
48	653	78/M	85	95	84	ND	ND	tris 12	C		
49	548	64/M	88	95	97	ND	10	del 13q	F		
50	379	67/F	88	90	96	20	28	del 13q	F		
51	173	72/M	51	92	97	7	26	ND	F		

Taula C2.1. Característiques dels pacients de LLC.

Abreviacions: Número ID, indica el número de identificació de pacient en el laboratori. ND: no determinat, F: fresques, C: criopreservades. Les alteracions genòmiques van ser determinades per FISH o MLPA (Coll-Mulet *et al.*, 2008).

CAPÍTOL 3.
EFFECTE DELS INHIBIDORS
SELECTIUS DE LES ISOFORMES DE PI3K
EN LES CÈL·LULES DE LLC

Introducció.

En la primera part d'aquesta memòria s'ha estudiat la via de PI3K, utilitzant inhibidors com el LY294002 i la wortmanina. Ara sabem que aquests inhibidors són força inespecífics i que inhibeixen altres quinases (Bain *et al.*, 2007). Durant el desenvolupament d'aquesta tesi, han anat sorgint inhibidors selectius de totes les isoformes de la classe I de PI3K. En col·laboració amb la Dra. Montserrat Camps de Merck Serono S.A., hem aconseguit obtenir aquests inhibidors. Així, aprofitant que disposàvem de les eines necessàries, vam voler estudiar el paper de cada una de les isoformes de la classe I de PI3K en les cèl·lules de LLC.

Els inhibidors dels que disposàvem provenen tots de l'empresa Merck Serono SA, i són:

- AS702630, inhibidor selectiu de p110 α (Draghetti *et al.*, 2009).
- AS606509, inhibidor selectiu de p110 δ (Sadhu *et al.*, 2003; Billottet *et al.*, 2006), també conegut com IC87114.
- AS252424, inhibidor selectiu de p110 γ (Pomel *et al.*, 2006).
- AS606565, inhibidor selectiu de p110 β i p110 δ (Jackson *et al.*, 2005), també conegut com TGX-115.
- AS605240, inhibidor selectiu de p110 α i δ (Barber *et al.*, 2005).

Les IC₅₀ in vitro de cada inhibidor es detallen a la Taula 1.

Inhibidor	In vitro IC ₅₀ (μ M)			
	α	β	δ	γ
AS702630	0.01	>10	0.46	0.33
AS606509	>20	1.82	0.07	1.24
AS252424	1	>20	>20	0.03
AS606565	>20	0.05	0.16	>20
AS605240	0.06	0.32	0.38	0.01
LY294002	0.7	0.31	1.33	7.26

Taula C3.1. Valors de la IC₅₀ enzimàtica *in vitro* dels inhibidors selectius de les isoformes de la classe I de PI3K. Calculats per Merck Serono S.A.

Resultats.**Els inhibidors selectius de les isoformes de PI3K indueixen apoptosi en les cèl·lules de LLC.**

En primer lloc, vam voler estudiar els efectes dels inhibidors selectius de les isoformes de PI3K en la viabilitat de les cèl·lules de LLC. Tal i com s'ha descrit al Capítol 1 d'aquesta memòria, l'inhibidor general de PI3K LY294002 indueix apoptosi en les cèl·lules de LLC. Per tant, amb la incubació de les cèl·lules amb els inhibidors selectius de les isoformes volíem clarificar quines eren les isoformes implicades en el manteniment de la viabilitat de les cèl·lules de LLC.

Vam incubar cèl·lules de LLC amb un rang de concentracions dels inhibidors AS702630, AS606509, AS252424, AS606565, AS605240 (5-50 μ M) durant 24 i 48 hores, i vam mesurar la viabilitat cel·lular. Els inhibidors de PI3K van induir apoptosi de manera dependent de la dosi i del temps (Figura C3.1), excepte el AS252424 (inhibidor de p110 γ), que no va induir apoptosi en les cèl·lules de LLC. Els inhibidors amb un efecte més pronunciat van ser AS702630 (inhibidor de p110 α), AS606509 (inhibidor de p110 δ), AS606565 (inhibidor de p110 β i p110 δ), i AS605240 (inhibidor de p110 α i p110 γ). Com a control d'una inhibició àmplia de tota l'activitat PI3K es va utilitzar el LY294002. Així, la incubació de les cèl·lules de LLC amb LY294002 20 μ M va disminuir la viabilitat cel·lular fins a $58.55 \pm 5.9\%$ (24 hores) i $49.73 \pm 9.9\%$ (48 hores).

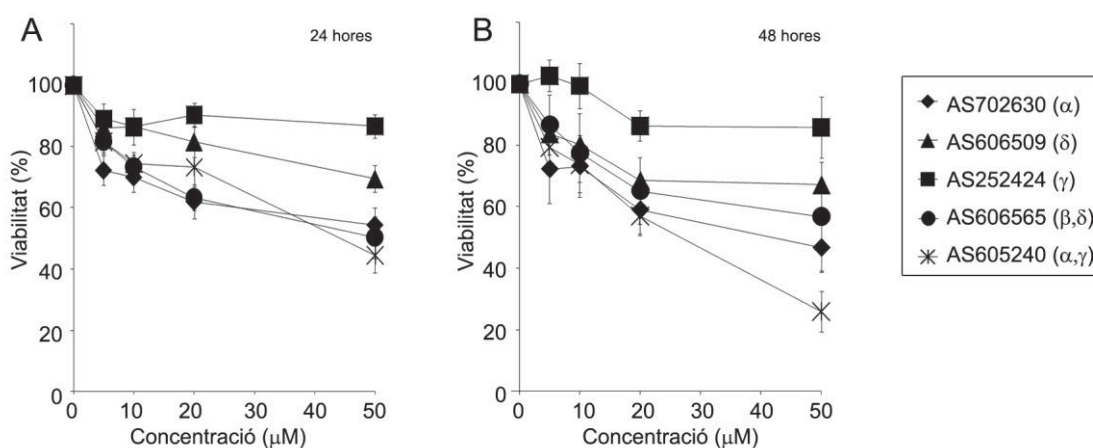


Figura C3.1. Dosi-resposta dels inhibidors selectius de les isoformes de PI3K en les cèl·lules de LLC. Cèl·lules de 5 pacients de LLC van ser incubades durant 24 (A) o 48 hores (B) amb un rang de dosis (5, 10, 20, 50 μ M) de AS702630, AS606509, AS252424, AS606565, AS605240. Es va mesurar la viabilitat per l'anàlisi de l'exposició de fosfatidilserina i captació d'IP, tal i com es descriu a "Pacients, materials i mètodes". La viabilitat està expressada com el percentatge sobre la viabilitat de les cèl·lules sense tractar. Les dades es mostren com el valor de la mitjana \pm SEM.

A continuació vam incubar els inhibidors amb cèl·lules de LLC de 22 pacients. En la majoria de pacients els inhibidors van induir apoptosi, però sorprenentment vam trobar que uns quants pacients (5 de 22) eren resistents a l'apoptosi induïda per la incubació amb els inhibidors de PI3K a 10 μ M. Així, vam agrupar els pacients en dos grups, sensibles i resistents. Vam considerar resistents aquells pacients on l'apoptosi induïda pel tractament amb qualsevol dels inhibidors de PI3K 10 μ M a les 48 hores era inferior al 20% respecte el control. Els pacients que eren resistents als inhibidors de PI3K també ho eren al LY294002 (Figura C3.2). Aquests resultats suggereixen que aquests pacients tenen altres vies activades que mantenen la supervivència de les cèl·lules de LLC quan les cultivem *in vitro*.

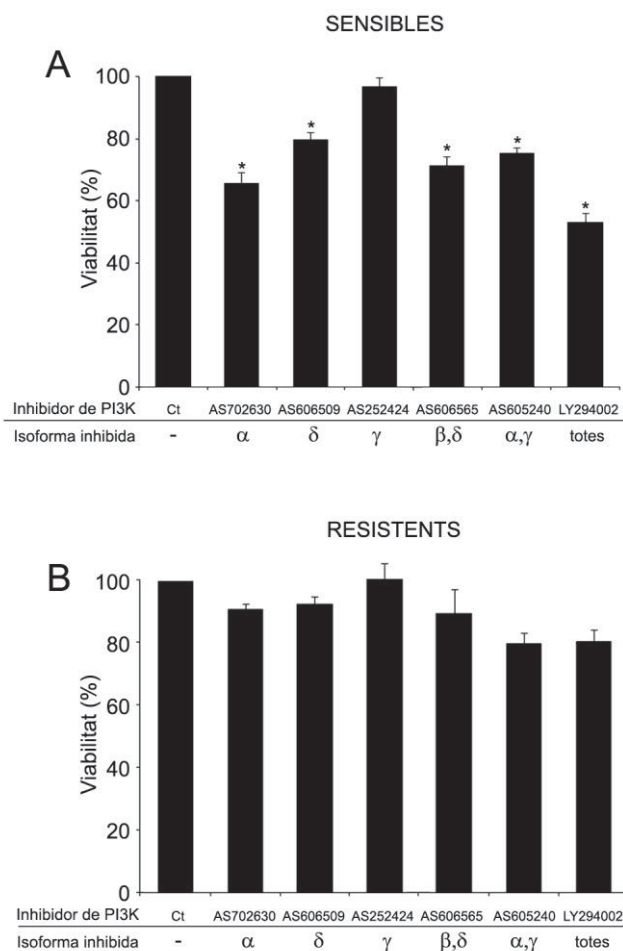


Figura C3.2. Efectes citotòxics dels inhibidors selectius de les isoformes de PI3K en les cèl·lules de LLC: pacients sensibles i resistents. Cèl·lules de LLC van ser incubades durant 48 hores amb AS702630, AS606509, AS252424, AS606565, AS605240 10 μ M i LY294002 20 μ M (n = 22, 17 mostres sensibles i 5 resistents). Es va mesurar la viabilitat per l'anàlisi de l'exposició de fosfatidilserina i captació d'IP, tal i com es descriu a "Pacients, materials i mètodes". La viabilitat està expressada com el percentatge sobre la viabilitat de les cèl·lules sense tractar. Les dades es mostren com el valor de la mitjana \pm SEM. *p<0.001 cèl·lules tractades *versus* control.

A continuació vam estudiar en els pacients sensibles, si amb la combinació de dos o tres dels inhibidors aconseguíem augmentar els efectes del tractament amb un sol inhibidor. Només vam fer combinacions amb els inhibidors que per si sols ja induïen apoptosi. Així, vam incubar les cèl·lules de LLC amb un, dos o tres inhibidors de PI3K a la dosi de 10 μ M, i vam quantificar la viabilitat cel·lular. Els inhibidors selectius de PI3K van induir apoptosi, i en combinar-los, vam obtenir efectes sumatoris, però en cap cas vam veure efectes sinèrgics (Figura C3.3). La inhibició de les isoformes p110 α , p110 β i p110 δ va ser la condició que va disminuir més la viabilitat, i l'apoptosi observada va ser molt similar al inhibir aquestes tres isoformes amb dos (AS702630, p110 α i AS606565, p110 β /p110 δ) o tres inhibidors (AS702630, p110 α , AS606509, p110 δ i AS606565, p110 β /p110 δ). L'addició del compost AS606509 (inhibidor de p110 δ) no va augmentar gaire la pèrdua de la viabilitat. Aquest resultat confirma el que havíem vist amb la incubació amb els inhibidors sols. p110 α i p110 β són les isoformes que participen majoritàriament en el manteniment de la viabilitat basal, i p110 δ hi contribueix en un menor grau. Amb la combinació dels tres inhibidors selectius de p110 α , p110 β i p110 δ a la dosi 10 μ M, vam aconseguir induir el mateix grau d'apoptosi que amb el tractament amb el LY294002 20 μ M (54.25 \pm 3.78% inhibidors p110 α , p110 β i p110 δ *versus* 59.52 \pm 5.43% LY294002).

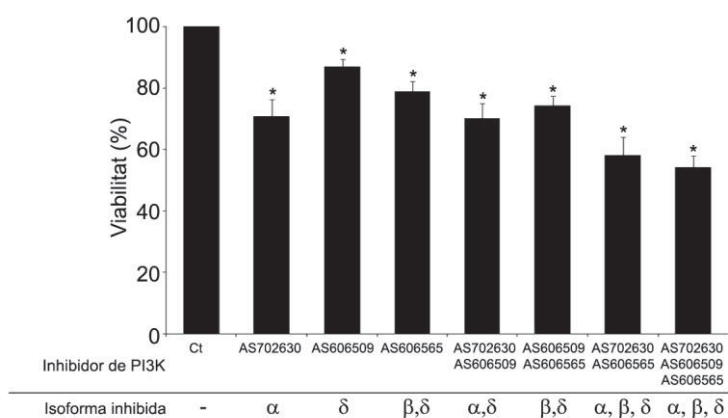


Figura C3.3. Efectes citotòxics de les combinacions d'inhibidors selectius de les isoformes de PI3K en les cèl·lules de LLC. Cèl·lules de LLC es van incubar durant 48 hores amb AS702630, AS606509, AS606565 10 μ M, i amb combinacions de dos o tres dels inhibidors (n = 8). Es va mesurar la viabilitat per l'anàlisi de l'exposició de fosfatidilserina i captació d'IP, tal i com es descriu a "Pacients, materials i mètodes". La viabilitat està expressada com el percentatge sobre la viabilitat de les cèl·lules sense tractar. Les dades es mostren com el valor de la mitjana \pm SEM. *p<0.001 cèl·lules tractades *versus* control.

Efecte diferencial dels inhibidors selectius de les isoformes de PI3K en cèl·lules B i T de LLC i de donants sans.

També vam estudiar si els limfòcits B i T mostraven diferent sensibilitat a l'apoptosi induïda pels inhibidors selectius de les isoformes de PI3K. Vam incubar les cèl·lules de LLC amb els inhibidors a 10 μ M durant 48 hores, i vam mesurar l'apoptosi en les cèl·lules B CD3⁻/CD19⁺ i cèl·lules T CD3⁺/CD19⁻. Els inhibidors de PI3K van induir apoptosi en les cèl·lules B, però no en les cèl·lules T (Figura C3.4A, n = 9). La incubació dels inhibidors selectius de les isoformes de PI3K a 10 μ M en cèl·lules de donants sans també va disminuir la viabilitat de les cèl·lules B però no la de les cèl·lules T. Així doncs, les cèl·lules T de donants sans també eren resistents a l'apoptosi induïda pels inhibidors de PI3K (Figura C3.4B, n = 4). Aquests resultats indiquen que les cèl·lules B normals i de LLC són més sensibles que les cèl·lules T a l'apoptosi induïda pels inhibidors selectius de les isoformes de PI3K.

Vam comparar els resultats obtinguts en les cèl·lules B de LLC i les cèl·lules B de donants sans, i tot i que s'observen petites diferències, aquestes no són significatives. Sembla que els limfòcits B normals són més sensibles a la inhibició de p110 β i p110 δ , i menys sensibles a la inhibició de p110 α que les cèl·lules B de LLC (Taula 2). Tot i que s'haurien d'augmentar els casos analitzats per verificar aquestes dades preliminars, aquests resultats suggereixen que la importància de cada una de les isoformes de PI3K en el manteniment de la viabilitat basal podria ser diferent en cèl·lules B de LLC i en cèl·lules B normals.

Inhibidor Isoforma inhibida	Viabilitat (%)		
	AS702630 α	AS606509 δ	AS606565 β i δ
Cèl·lules B de donants sans	66.86 \pm 5.7%	66.63 \pm 7.29%	61.41 \pm 6.77%
Cèl·lules B de LLC	56.65 \pm 6.54%	78.18 \pm 6.15%	70.83 \pm 5.43%

Taula C3.2. Valors de la viabilitat en cèl·lules B normals i en cèl·lules B de LLC després del tractament amb els inhibidors selectius de les isoformes de PI3K. Cèl·lules de LLC (n = 9) i de donants sans (n = 4) es van incubar durant 48 hores amb LY294002 20 μ M, AS702630, AS606509 o AS606565 10 μ M. La viabilitat es va mesurar com cèl·lules no apoptòtiques T CD3⁺/CD19⁻ o cèl·lules no apoptòtiques B CD3⁻/CD19⁺ de donants sans i de mostres de LLC, i està expressada com el percentatge sobre la viabilitat de les cèl·lules sense tractar. Els resultats es mostren com el valor de la mitjana \pm SEM.

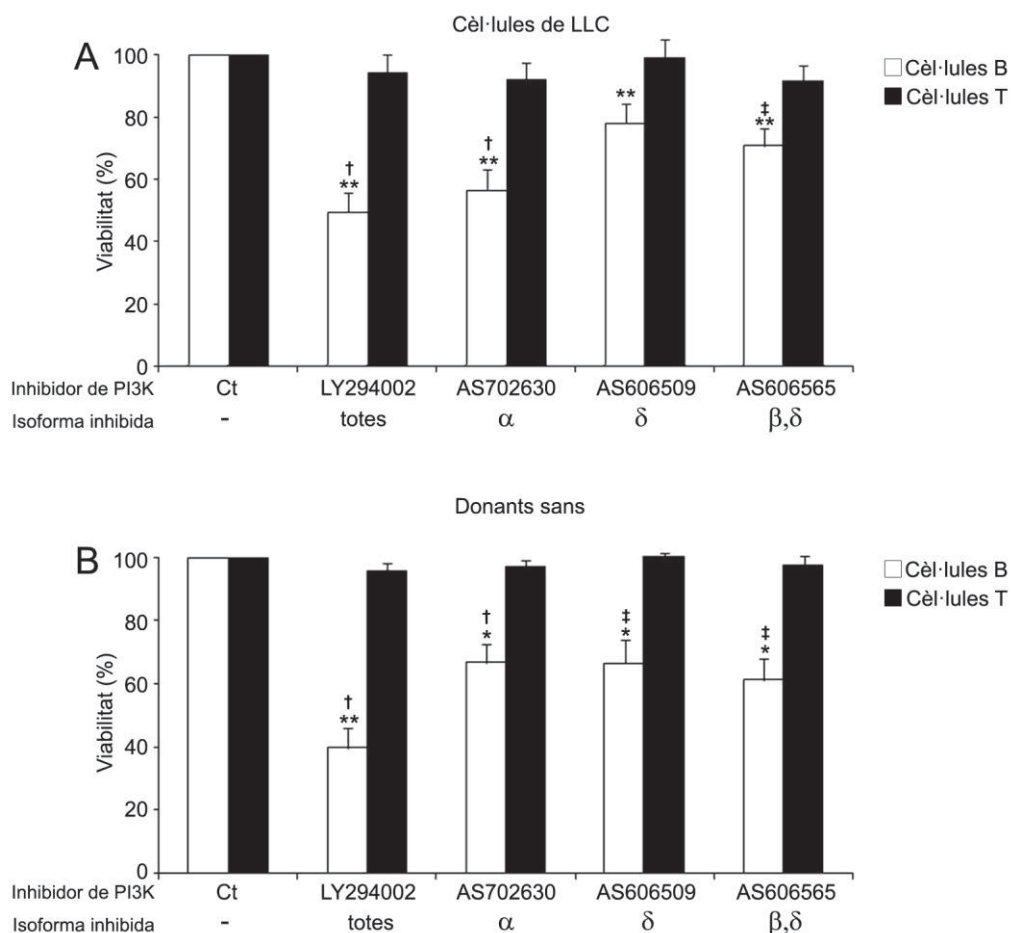


Figura C3.4. Efectes diferencials dels inhibidors selectius de les isoformes de PI3K en les cèl·lules B i T de LLC i de donants sans. (A) Cèl·lules de pacients de LLC (n = 9) i (B) de donants sans (n = 4) es van incubar durant 48 hores amb LY294002 20 μM, AS702630, AS606509 o AS606565 10 μM. La viabilitat es va mesurar com cèl·lules no apoptòtiques T CD3⁺/CD19⁻ o cèl·lules no apoptòtiques B CD3⁻/CD19⁺ de donants sans i de mostres de LLC. La viabilitat està expressada com el percentatge sobre la viabilitat de les cèl·lules sense tractar. Els resultats es mostren com el valor de la mitjana ± SEM. **p<0.005, *p<0.01 cèl·lules tractades versus control, †p<0.005, ‡p<0.01 cèl·lules B versus cèl·lules T.

La Nutlina-3a augmenta l'apoptosi induïda pels inhibidors selectius de les isoformes de PI3K.

La Nutlina-3a és un inhibidor potent i selectiu de MDM2, que actua activant p53, alliberant-lo del control negatiu que exerceix MDM2. Al nostre grup hem descrit que la Nutlina-3a és capaç d'induir apoptosi en les cèl·lules de LLC *in vitro* en pacients amb TP53 *wild type* (*wt*) (Coll-Mulet *et al.*, 2006). Recentment, s'ha descrit que la Nutlina-3a podria incrementar l'apoptosi induïda per la inhibició de la via de PI3K/Akt en cèl·lules TP53 *wt* de manera dependent de PTEN (Zhu *et al.*, 2008).

Vam incubar les cèl·lules de LLC de pacients TP53 *wt* amb els inhibidors de PI3K a 10 μ M, sols o en combinació amb Nutlina-3a 5 μ M, i vam mesurar la viabilitat cel·lular després de 24 hores de tractament. Els inhibidors selectius de les isoformes de PI3K i la Nutlina-3a van induir apoptosi en les cèl·lules de LLC quan es van incubar de manera individual, i amb la seva combinació vam observar lleugers efectes additius en la viabilitat cel·lular (Figura C3.5), però en cap combinació l'efecte va ser estadísticament significatiu.

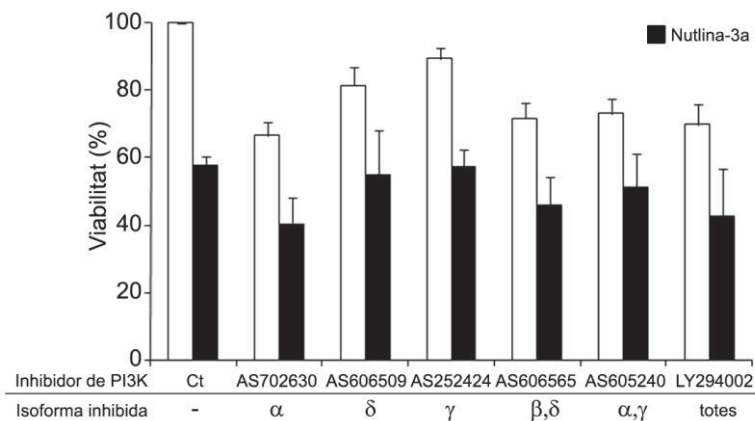


Figura C3.5. Efecte citotòxic dels inhibidors selectius de les isoformes de PI3K en combinació amb Nutlina-3a en les cèl·lules de LLC. Cèl·lules de LLC van ser incubades durant 24 hores amb AS702630, AS606509, AS252424, AS606565, AS605240 10 μ M i amb Nutlina-3a 5 μ M ($n = 4$). Es va mesurar la viabilitat per l'anàlisi de l'exposició de fosfatidilserina i captació d'IP, tal i com es descriu a "Pacients, materials i mètodes". La viabilitat està expressada com el percentatge sobre la viabilitat de les cèl·lules sense tractar. Les dades es mostren com el valor de la mitjana \pm SEM.

Caracterització de l'apoptosi induïda pels inhibidors selectius de les isoformes de PI3K.

A continuació vam investigar el perfil d'expressió d'ARNm de gens relacionats amb l'apoptosi induït pel tractament amb els inhibidors de PI3K mitjançant la tècnica del RT-MLPA (Eldering *et al.*, 2003). Ni el tractament amb els inhibidors de selectius de les isoformes de PI3K a 10 µM ni amb l'inhibidor general de PI3K LY294002 durant 24 hores, van induir cap canvi significatiu en els nivells d'ARNm estudiats per RT-MLPA (Figura C3.6, n = 2). Aquests resultats indiquen que la inhibició de la via PI3K té efectes mínims en el perfil d'expressió de gens relacionats amb l'apoptosi i el seus efectes en viabilitat deuen ser deguts a efectes posttranscripcionals.

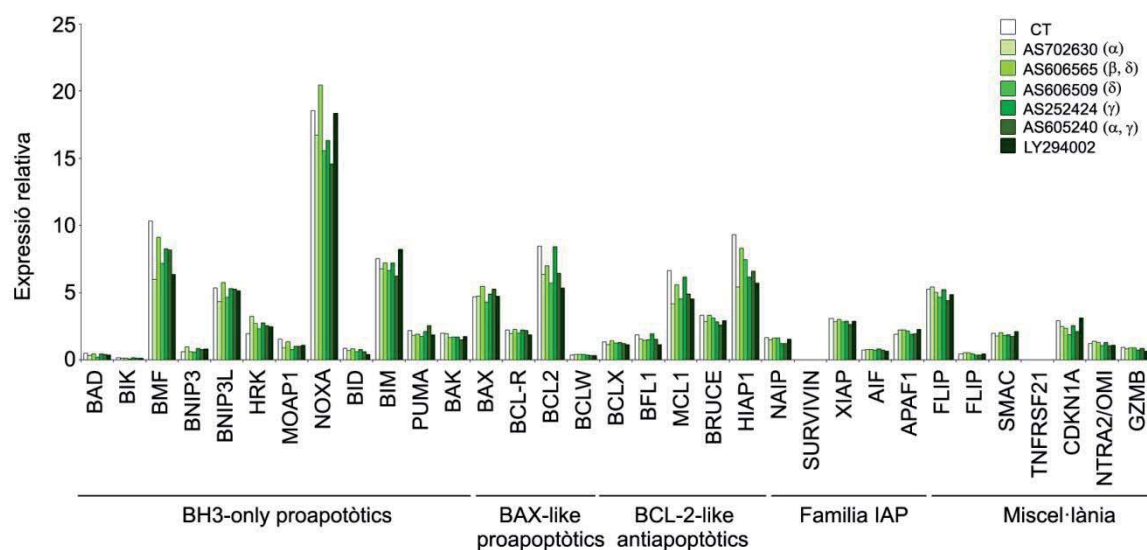


Figura C3.6. Perfil d'expressió de gens relacionats amb l'apoptosi. Cèl·lules de LLC van ser no tractades (barres blanques) o tractades (barres verdes) amb AS702630, AS606565, AS606509, AS252424, AS605240 10 µM o LY294002 20 µM durant 24 hores. Les cèl·lules es van lisar i el perfil d'expressió de gens relacionats amb l'apoptosi es va analitzar per RT-MLPA, tal i com es descriu a "Pacients, materials i mètodes". La suma de les dades de tots els pics es va fixar al 100% per normalitzar fluctuacions en la senyal total entre mostres, i els pics individuals es van calcular respecte al valor del 100%. Es mostra el resultat d'un pacient representatiu (n = 2).

CAPÍTOL 4.
EFFECTES DELS ALQUILFOSFOLÍPIDS
EDELFOSSINA I PERIFOSSINA
EN LES CÈL·LULES DE LLC

Introducció.

Amb l'objectiu de buscar noves drogues que interferissin la via de PI3K/Akt, ens vam plantejar estudiar els efectes de dos alquilfosfolípids, edelfosina i perifosina, en les cèl·lules de LLC, en col·laboració amb els grups del Dr. Faustino Mollinedo (Centro de Investigación del Cáncer, Salamanca) i de la Dra. Dolors Colomer (IDIBAPS- Hospital Clínic-UB, Barcelona).

Els alquilfosfolípids sintètics (ALPs) es van desenvolupar al principi dels anys 70, i durant el procés de desenvolupament es va veure que posseïen propietats antiproliferatives en cèl·lules tumorals (Runge *et al.*, 1980).

S'ha descrit que els ALPs poden induir apoptosi mitjançant tres mecanismes principals (Vink *et al.*, 2007):

1. *Inhibició de vies de supervivència i proliferació.* S'ha descrit que edelfosina i perifosina inhibeixen Akt, disminuint la fosforilació en Ser473 i Thr308 (Ruiter *et al.*, 2003). Sembla que aquesta inhibició es deu a la inhibició del reclutament d'Akt a la membrana plasmàtica, ja que ni edelfosina i ni perifosina no inhibeixen PI3K, PDK1, ILK ni Src, i a més, l'activitat d'una Akt constitutivament ancorada a la membrana plasmàtica (myr.Akt) no es veu afectada pel tractament amb perifosina (Kondapaka *et al.*, 2003). Aquest efecte sobre la fosforilació i l'activitat d'Akt es va confirmar més tard per edelfosina (Beneteau *et al.*, 2008). A més, s'ha descrit que en cèl·lules de diferents leucèmies, com la leucèmia mieloide aguda i el mieloma múltiple, tots dos ALPs indueixen apoptosi i inhibeixen Akt (Beneteau *et al.*, 2008; Papa *et al.*, 2008; Tazzari *et al.*, 2008), i que aquesta acció apoptòtica és dóna de manera diferencial en cèl·lules leucèmiques *versus* cèl·lules de tumors sòlids (Nieto-Miguel *et al.*, 2006).

2. *Inducció de senyalització d'estrès i apoptosi.* S'ha descrit que edelfosina i perifosina indueixen apoptosi per la via extrínseca, per reclutament dels receptors de mort de manera independent al seu lligand. Edelfosina i perifosina indueixen una reorganització del contingut proteic dels *lipid rafts*, reclutant els receptors de mort Fas/CD95, DR4 i DR5, junt a altres molècules de la via, com FADD, caspasa-8 i Bid (Gajate *et al.*, 2001; Gajate *et al.*, 2004; Gajate *et al.*, 2007). Gràcies a la presència de Bid, aquests ALPs són capaços d'activar la via intrínseca d'apoptosi i induir l'alliberament de citocrom *c*. Sembla que només el reclutament de Fas/CD95 és imprescindible per l'efecte apoptòtic de edelfosina i perifosina (Gajate *et al.*, 2000; Gajate *et al.*, 2001; Gajate *et al.*, 2004).

3. *Interferència en el recanvi i la senyalització de fosfolípids.* Gràcies a la seva estructura, els ALPs s'intercalen en la membrana plasmàtica, on poden actuar com detergents, donant lloc a la lisi directa de la cèl·lula. A més, interfereixen en el recanvi i la senyalització dels fosfolípids (Boggs *et al.*, 1995).

Edelfosina, considerada el prototip dels ALPs, va ser el primer agent antitumoral en mostrar activitat a través dels *lipid rafts*, dominis que recentment han estat involucrats en l'acció quimioterapèutica d'altres agents antitumorals (Delmas *et al.*, 2004; Lacour *et al.*, 2004; Gajate *et al.*, 2005; Mollinedo *et al.*, 2006; Gajate *et al.*, 2007; Reis-Sobreiro *et al.*, 2009). Els *lipids rafts* són microdominis de la membrana plasmàtica enriquits en colesterol i esfingolípds, i tenen una mida entre 50 i 70 nM. Les proteïnes localitzades en aquests microdominis tenen limitada la seva difusió per la membrana plasmàtica, de manera que s'afecten les seves capacitats funcionals (Simons *et al.*, 2000).

Amb tots aquests antecedents, ens va semblar interessant estudiar els efectes d'edelfosina i perifosina en les cèl·lules de LLC, ja que un possible mecanisme d'acció era la inhibició d'Akt i que s'havia descrit que induïen apoptosi en cèl·lules de leucèmia (AML i MM), però no hi havia cap dada respecte als seus efectes en LLC. Així, en aquest quart capítol de la memòria hem estudiat els efectes i el possible mecanisme d'acció dels ALPs en les cèl·lules de LLC.

Resultats.

Edelfosina i perifosina induïxen apoptosi en les cèl·lules de LLC.

En primer lloc, vam voler estudiar si edelfosina i perifosina induïen apoptosi en les cèl·lules de LLC. Vam incubar les cèl·lules de LLC amb un rang de concentracions d'elfosina i perifosina (10-50 μM) i vam mesurar la viabilitat cel·lular per citometria de flux després de 24 hores de tractament. Tots dos ALPs van induir apoptosi de manera dependent de dosi i de temps (Figura C4.1).

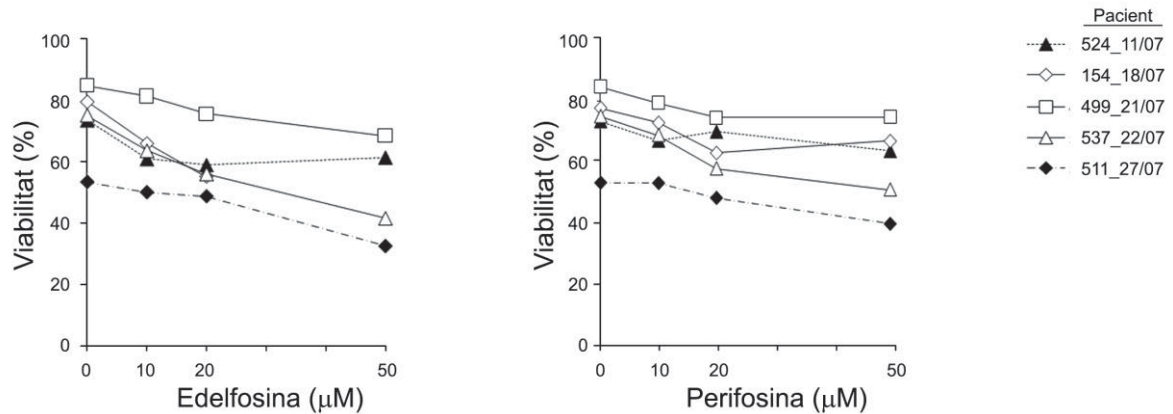


Figura C4.1. Efecte citotòxic d'edelfosina i perifosina en cèl·lules de LLC. Cèl·lules de LLC van ser incubades amb varies dosis d'edelfosina i perifosina ($n = 5$). Es va mesurar la viabilitat per l'anàlisi de l'exposició de fosfatidilserina i captació d'IP, tal i com es descriu a "Pacients, materials i mètodes". La viabilitat està expressada com el percentatge sobre la viabilitat de les cèl·lules sense tractar. Es mostren els resultats de 5 pacients analitzats.

Efecte diferencial d'edelfosina i perifosina en cèl·lules B i T de LLC.

S'ha descrit que els limfòcits B i T normals són resistents a l'apoptosi induïda per edelfosina i perifosina (Beneteau *et al.*, 2008). Així, vam voler comprovar si hi havia diferències en la sensibilitat de les cèl·lules B i T de LLC a l'apoptosi induïda per aquests dos ALPs. El número de cèl·lules B $\text{CD3}^-/\text{CD19}^+$ i cèl·lules T $\text{CD3}^+/\text{CD19}^-$ apoptòtiques es va mesurar en mostres de LLC exposades a diferents dosis d'edelfosina i perifosina (fins a 50 μM) durant 24 i 48 hores. El tractament amb edelfosina 50 μM durant 24 hores va reduir el percentatge de cèl·lules de LLC viables a $59.2 \pm 8.3\%$ ($n = 5$), mentre que el percentatge de cèl·lules T viables de les mostres de LLC va ser $75.9 \pm 4\%$ ($n = 5$). La incubació amb perifosina 50 μM durant 24 hores va reduir el percentatge de cèl·lules de LLC viables a $75.6 \pm 4.3\%$ ($n = 5$). Contràriament, el percentatge de cèl·lules T viables de les mostres de LLC va ser $87.8 \pm 3\%$ ($n = 5$). Aquestes diferències en l'apoptosi entre cèl·lules B i T es van accentuar a les 48 hores d'incubació. El tractament amb edelfosina 50 μM va reduir el percentatge de cèl·lules de LLC viables a $23.7 \pm 5.9\%$ ($n = 5$),

mentre que el percentatge de cèl·lules T viables de les mostres de LLC va ser $67.6 \pm 3.6\%$ ($n = 5$). El tractament amb perifosina $50 \mu\text{M}$ va reduir el percentatge de cèl·lules de LLC viables a $41.1 \pm 9.8\%$ ($n = 5$). Contràriament, el percentatge de cèl·lules T viables de les mostres de LLC va ser $78 \pm 4.5\%$ ($n = 5$) (Figura C4.2).

Aquests resultats indiquen que les cèl·lules B de mostres de LLC són més sensibles que les cèl·lules T a l'apoptosi induïda per edelfosina i perifosina.

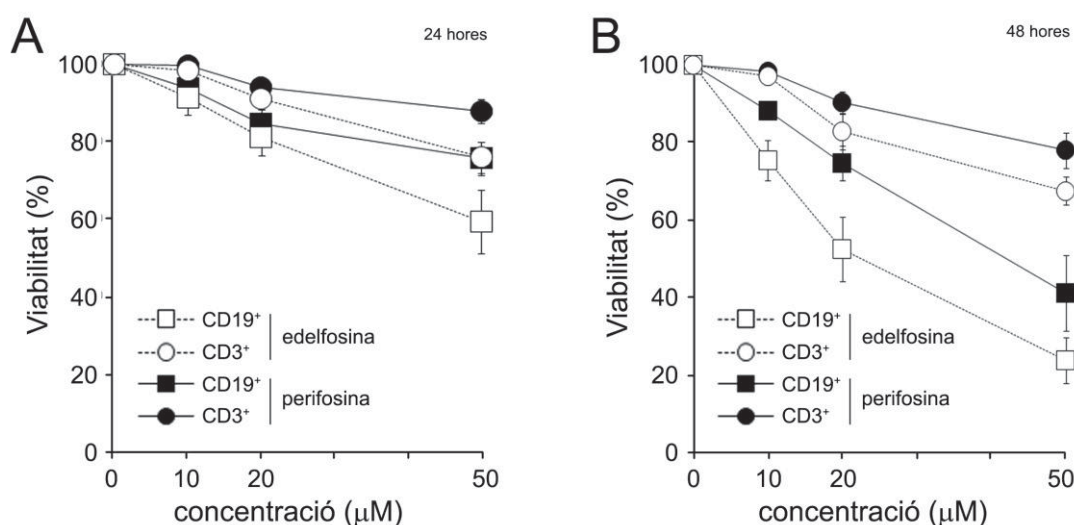


Figura C4.2. Efecte diferencial d'edelfosina i perifosina en cèl·lules B i T. Cèl·lules de LLC durant 24 (A) i 48 hores (B) sense o amb varies dosis d'edelfosina i perifosina ($n = 5$). La viabilitat es va mesurar com cèl·lules no apoptòtiques T $\text{CD}3^+/\text{CD}19^-$ o cèl·lules no apoptòtiques B $\text{CD}3^-/\text{CD}19^+$. La viabilitat està expressada com el percentatge sobre la viabilitat de les cèl·lules sense tractar. Els resultats es mostren com el valor de la mitjana \pm SEM.

Edelfosina i perifosina no inhibeixen la fosforilació d'Akt en les cèl·lules de LLC.

Edelfosina i perifosina poden induir mort cel·lular per diferents mecanismes, tal i com s'ha revisat a la introducció d'aquest capítol. S'ha descrit que en cèl·lules de leucèmia mieloide aguda i mieloma múltiple, edelfosina i perifosina inhibeixen la fosforilació d'Akt (Hideshima *et al.*, 2006; Beneteau *et al.*, 2008; Papa *et al.*, 2008; Tazzari *et al.*, 2008). Per comprovar si l'apoptosi induïda per edelfosina i perifosina era deguda a la inhibició d'Akt, vam analitzar si aquests dos ALPs inhibien la fosforilació d'Akt en les cèl·lules de LLC. Vam examinar l'estat de fosforilació d'Akt en el residu Ser473 i vam comprovar que la incubació amb edelfosina $10 \mu\text{M}$ i perifosina $10 \mu\text{M}$ durant 1 hora o 6 hores no inhibia la fosforilació d'Akt en cèl·lules de LLC (Figura C4.3, $n = 3$).

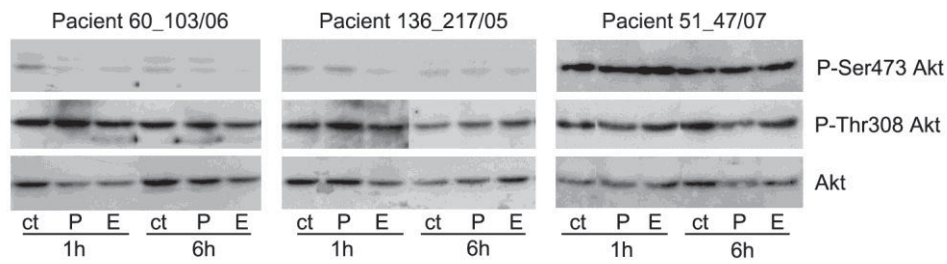


Figura C4.3. Efectes d'edelfosina i perifosina en la fosforilació d'Akt. Les cèl·lules de LLC es van incubar amb edelfosina 10 μ M o perifosina 10 μ M durant 1 i 6 hores. Les cèl·lules es van lissar i els extractes totals es van analitzar per Western blot tal i com s'ha descrit a "Pacients, materials i mètodes". Es mostren els resultats de tres pacients estudiats (n = 3).

A continuació, vam estudiar si edelfosina i perifosina tenien algun efecte en la fosforilació d'Akt induïda per factors de supervivència. Vam incubar les cèl·lules amb PMA i SDF-1 α , dos compostos que hem tal i com hem descrit al capítol 1 d'aquesta memòria induïxen un augment de viabilitat i la fosforilació d'Akt. Així, vam preincubar les cèl·lules de LLC amb edelfosina 10 μ M i perifosina 10 μ M durant 6 hores i a continuació vam afegir PMA o SDF-1 α . Cap dels dos ALPs va ser capaç de bloquejar la fosforilació induïda per PMA o SDF-1 α (Figura C4.4). Com a control del bloqueig de la fosforilació, vam preincubar les cèl·lules durant 1 hora amb Bis I 5 μ M (per bloquejar la fosforilació induïda per PMA) i LY294002 20 μ M (per bloquejar la fosforilació induïda per SDF-1 α).

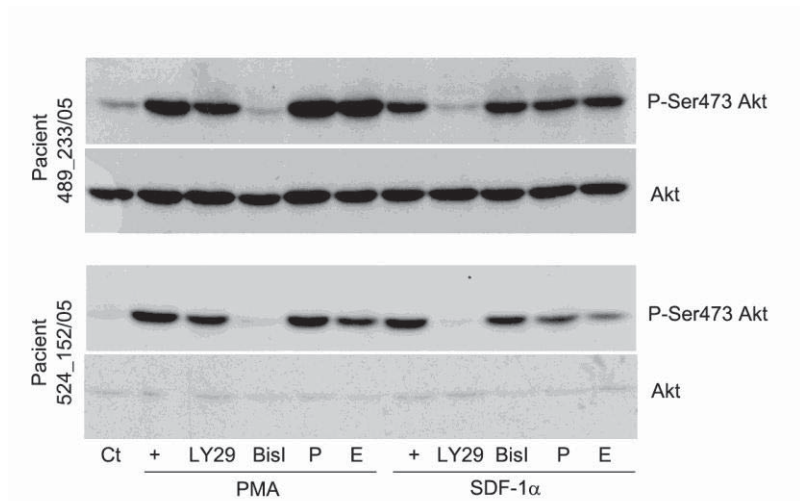


Figura C4.4. Efectes d'edelfosina i perifosina en la fosforilació d'Akt induïda per PMA i SDF-1 α . Les cèl·lules de LLC es van incubar amb edelfosina 10 μ M o perifosina 10 μ M durant 1 i 6 hores. Les cèl·lules es van lissar i els extractes totals es van analitzar per Western blot tal i com s'ha descrit a "Pacients, materials i mètodes". Es mostren els resultats de dos pacients (n = 2).

Estudi dels nivells d'expressió dels receptors de mort

Com que un dels mecanismes d'acció descrits per edelfosina i perifosina és el reclutament de Fas/CD95 i la inducció d'apoptosi independent de lligand, vam estudiar l'expressió dels receptors de morts en les cèl·lules de LLC. Vam comprovar que les cèl·lules B CD19⁺ de pacients de LLC expressen nivells variables dels receptors de mort Fas/CD95, DR4 i DR5, amb una intensitat de fluorescència mitja també variable (Figura C4.5A i B), i que els nivells d'expressió d'aquests receptors no correlacionen amb la resposta a edelfosina i perifosina (Figura C4.5C). És a dir, en les mostres que expressen més receptors de mort no es veu una inducció d'apoptosi per edelfosina i perifosina més gran que en les mostres que expressen nivells més baixos d'aquests receptors.

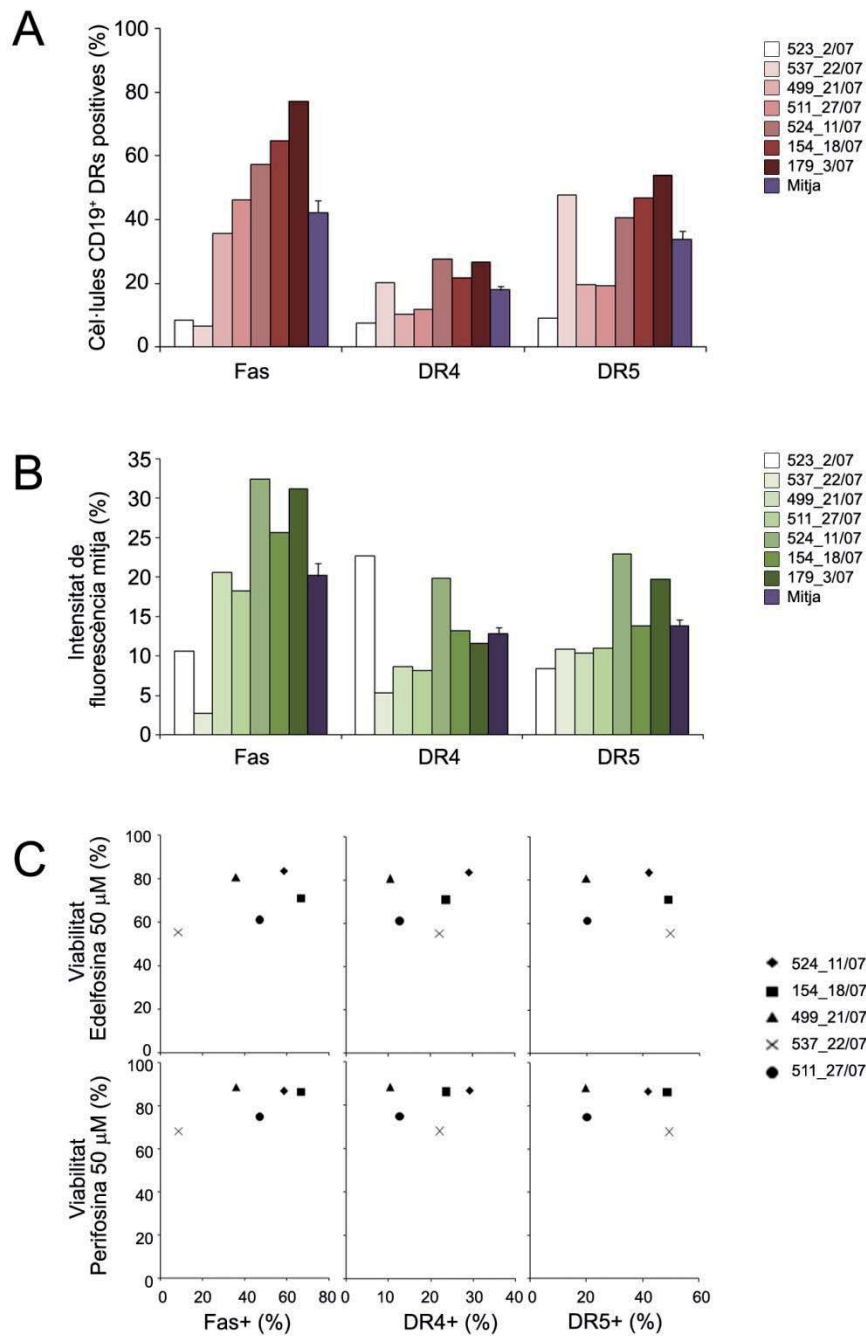


Figura C4.5. Nivells d'expressió dels receptors de mort. Els nivells basals d'expressió dels receptors de mort Fas/DR4/DR5 (A) i la seva intensitat de fluorescència mitja (IFM) (B) es van mesurar en cèl·lules de LLC mitjançant anticossos específics per citometria de flux. Es mostren els resultats dels 7 pacients estudiats i la mitja de tots ells (barra lila). (C) Correlació entre els nivells d'expressió dels receptors de mort i l'apoptosi induïda per edelfosina i perifosina. La viabilitat es va mesurar per l'anàlisi de l'exposició de fosfatidilserina i captació d'IP, tal i com es descriu a "Pacients, materials i mètodes", i està expressada com el percentatge sobre la viabilitat de les cèl·lules sense tractar. Es mostra el percentatge de cèl·lules CD19⁺ que expressen receptors de mort Fas, DR4 i DR5, mesurat per citometria de flux (n = 5).

Caracterització de l'apoptosi induïda per edelfosina i perifosina en les cèl·lules de LLC.

Vam investigar l'efecte d'edelfosina i perifosina en el perfil d'expressió d'ARNm de gens relacionats amb apoptosi, mitjançant la tècnica de RT-MLPA (descrita detalladament a "Pacients, materials i mètodes"). El tractament de les cèl·lules de LLC amb edelfosina 50 µM durant 24 hores va induir un augment en els missatgers de *NOXA* i *PUMA* en les dues mostres analitzades i un augment de *HIAP1* en una de les mostres. En canvi, el tractament de les cèl·lules de LLC amb perifosina 50 µM durant 24 hores no va induir cap canvi significatiu en el perfil de RT-MLPA, només un augment en el missatger de *HIAP1* en una de les dues mostres analitzades (Figura C4.6, n = 2).

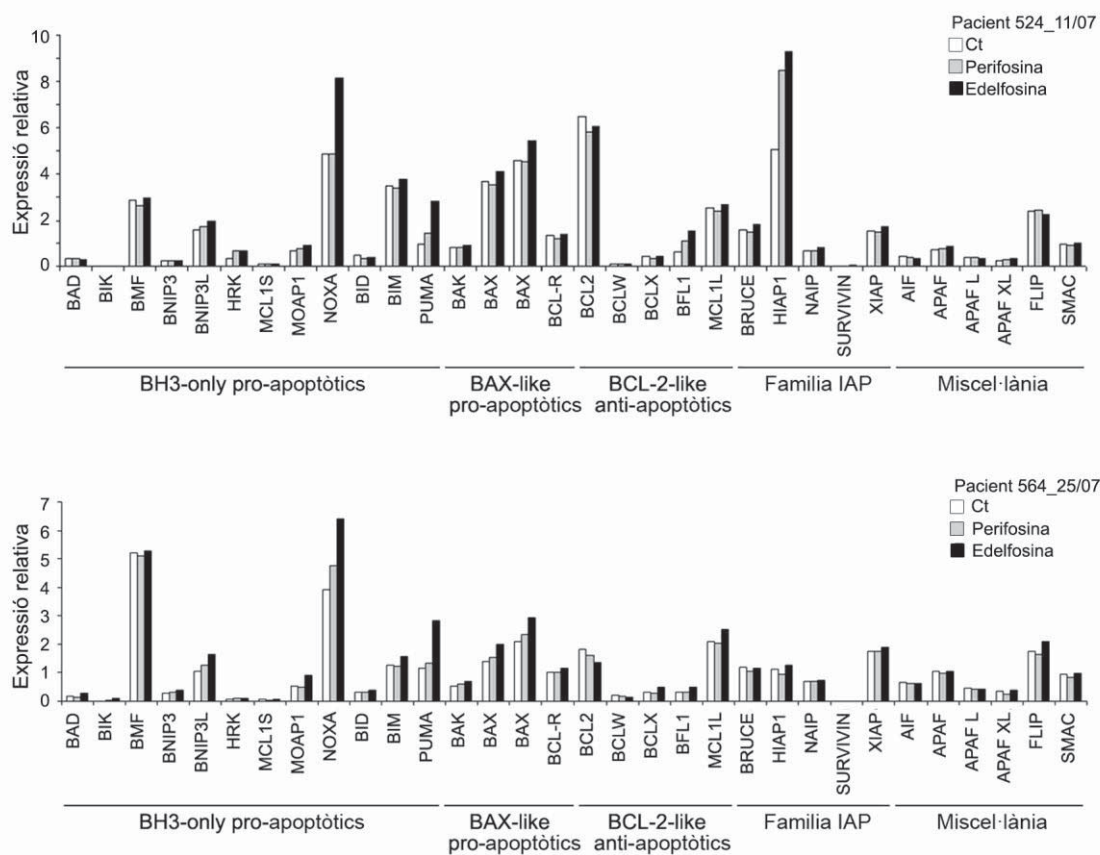


Figura C4.6. Perfil d'expressió de gens relacionats amb l'apoptosi. Cèl·lules de LLC van ser no tractades (barres blanques) o tractades amb perifosina 50 µM (barres grises) o edelfosina 50 µM (barres negres) durant 24 hores. Les cèl·lules es van lisar i el perfil d'expressió de gens relacionats amb l'apoptosi es va analitzar per RT-MLPA, tal i com es descriu a "Pacients, material i mètodes". La suma de les dades de tots els pics es va fixar al 100% per normalitzar fluctuacions en la senyal total entre mostres, i els pics individuals es van calcular respecte al valor del 100%. Es mostren els resultats de dos pacients analitzats (n = 2).

DISCUSSIÓ

DISCUSSIÓ

REGULACIÓ D'AKT PER VIES DEPENDENTS I INDEPENDENTS DE PI3K EN LES CÈL·LULES DE LLC: PAPER DE PKC β

En el primer capítol de la memòria hem estudiat la regulació i les funcions d'Akt en les cèl·lules de LLC i de donants sans. Hem reproduït resultats previs del nostre i d'altres grups, i utilitzant noves eines, hem ampliat aquest estudi.

En primer lloc, els nostres resultats demostren que les cèl·lules de LLC presenten fosforilació basal d'Akt en els residus Ser473 i Thr308, i a més, hem demostrat que Akt està activa, ja que els seus substrats es troben fosforilats. Altres grups també han demostrat aquesta fosforilació i activitat basal (Cuni *et al.*, 2004; Petlickovski *et al.*, 2005; Ticchioni *et al.*, 2007; Zhuang *et al.*, 2009), tot i que hi ha publicacions amb resultats contraris (Muzio *et al.*, 2008). Recentment, Zhuang i col·laboradors han descrit que la detecció de la fosforilació d'Akt per Western blot depèn del tampó de lisi utilitzat (Zhuang *et al.*, 2009). En les nostres mans, amb tots els tampons de lisi utilitzats (desnaturalitzants i no desnaturalitzants) hem estat capaços de detectar aquesta fosforilació. També hem demostrat que aquesta fosforilació disminueix i pot arribar a desaparèixer al sotmetre les cèl·lules a un cicle de congelació/descongelació.

Utilitzant inhibidors selectius, hem observat que en la majoria de pacients, aquesta fosforilació basal d'Akt és dependent de PI3K, ja que la incubació amb LY294002 la bloqueja. En altres pacients, aquesta fosforilació és bloquejada per Bis I, per tant, dependent de PKC. Els nostres resultats mostren que PKC β participa parcialment en la fosforilació i activació d'Akt independentment de PI3K en les cèl·lules de LLC. Altres isoformes de PKC podrien estar implicades en aquesta fosforilació i activació, com per exemple la isoforma PKC δ , que s'ha descrit activa en cèl·lules de LLC (Baudot *et al.*, 2009). Aquest via d'activació d'Akt independent de PI3K ha estat descrita per altres autors, que demostren que l'activació de PKC és suficient per induir la fosforilació d'Akt en alguns tipus cel·lulars (Li *et al.*, 1999; Kroner *et al.*, 2000; Tenzer *et al.*, 2001; Bae *et al.*, 2002; Barragan *et al.*, 2002; Glikli *et al.*, 2002; Bauer *et al.*, 2003; Blalock *et al.*, 2003; Aeder *et al.*, 2004; Kawakami *et al.*, 2004; Partovian *et al.*, 2004; Barragan *et al.*, 2006).

Quin és l'estímul que activa Akt de manera independent de PI3K en les cèl·lules de LLC? Els nostres resultats descarten la IL-4, el SDF-1 α , i l'activació del BCR, ja que en tots tres casos la fosforilació d'Akt que indueixen és inhibida per LY294002, però no per Bis I ni per LY333531. Per tant, indueixen la fosforilació d'Akt per la via clàssica, de manera dependent de PI3K. S'ha descrit que l'activació de CD5 en les cèl·lules de LLC indueix supervivència en alguns pacients, a través d'un mecanisme dependent de PKC, però independent d'Akt, ja que la incubació de les cèl·lules amb anti-CD5 no n'indueix la fosforilació (Perez-Chacon *et al.*, 2007). Així doncs, per poder estudiar aquesta via de fosforilació d'Akt dependent de PKC i independent de PI3K hem utilitzat els èsters de forbol. La Dra. Montserrat Barragán ja va descriure que el PMA induïa la fosforilació d'Akt en Ser473 independentment de PI3K (Barragan *et al.*, 2002), però es

desconeixia l'efecte sobre la Thr308 i si a més, estava activant Akt o no. A més, s'ha descrit que els èsters de forbol indueixen la fosforilació d'Akt en plaquetes humanes, limfòcits T murins i la línia mieloide FDC-P1 (Kroner *et al.*, 2000; Bauer *et al.*, 2003; Blalock *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004). Els nostres resultats demostren que la incubació amb PMA indueix la fosforilació d'Akt en Ser473 i en Thr308, i a més, n'indueix l'activació, ja que a l'incubar les cèl·lules de LLC amb PMA augmenta la fosforilació dels substrats d'Akt, com GSK-3 β i FoxO3a. A més, la incubació de les cèl·lules amb PMA durant 24 o 48 hores indueix un augment de la viabilitat cel·lular.

En el moment de realitzar aquest estudi, es desconeixia la quinasa responsable de la fosforilació d'Akt en Ser473, anomenada PDK2. Així que ens vam plantejar estudiar quina seria la PDK2 activada per PMA. Els nostres resultats van descartar la via de MAPK, ja que els inhibidors de p38 i de MEK no van afectar a la fosforilació induïda per PMA. Vam demostrar que una quinasa inhibible per estaurosporina i genisteïna estava implicada.

S'ha descrit que les isoformes clàssiques de PKC, particularment PKC β II, regula l'activitat d'Akt per fosforilació directa del residu crític Ser473 *in vitro* i en mastòcits estimulats amb Fc ϵ RI (receptor d'alta afinitat Fc per la IgE) (Kawakami *et al.*, 2004). A més, les PKC són inhibibles per estaurosporina i genisteïna (Omura *et al.*, 1977; Gescher, 1998). Així, PKC β és una candidata a fosforilar Akt en Ser473 en cèl·lules de LLC. Es desconeix si PKC β està implicada en la fosforilació d'Akt en plaquetes i cèl·lules mieloides. Els nostres resultats indiquen que la fosforilació d'Akt induïda per PMA en limfòcits humans B i T és dependent de PKC β , ja que la incubació amb LY333531 bloqueja completament la fosforilació d'Akt induïda per PMA. Posteriorment, altres autors han descrit resultats similars en LLC amb un altre inhibidor de PKC β , l'enzastaurin (Holler *et al.*, 2009). Les cèl·lules de LLC expressen nivells alts de la proteïna PKC β (Alkan *et al.*, 2005; Abrams *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007) i això dona la possibilitat que PKC β pogués estar desregulada en aquestes cèl·lules de leucèmia. Holler i col·laboradors han demostrat recentment en un model murí, que PKC β és essencial en el desenvolupament de la LLC (Holler *et al.*, 2009). A més, és possible que PKC β jugui un paper en l'activació d'Akt en altres leucèmies (Li *et al.*, 2007).

Estudis *in vitro* demostren que PKC β fosforila directament Akt en Ser473 sense afectar els nivells de fosforilació del residu Thr308 (Kawakami *et al.*, 2004). Però en les cèl·lules de LLC, la inhibició de la PKC β disminueix la fosforilació de tots dos residus, Ser473 i Thr308. Com que la fosforilació en Thr308 induïda per PMA no és inhibida pel LY294002, aquests resultats suggereixen que una proteïna quinasa que actua per sota de PKC β intervé en la fosforilació de Thr308 independentment de PI3K en les cèl·lules de LLC. Alternativament, PKC β podria induir l'activació de PDK1 independentment de PI3K, tal i com s'ha descrit per la tirosina quinasa RET/PTC (Kim *et al.*, 2003). Finalment, la disminució en la fosforilació en Thr308 induïda pel LY333531 és consistent amb el model en que la fosforilació en Ser473 precedeix la fosforilació en Thr308 per una PDK1 constitutivament activa (Scheid *et al.*, 2002; Woodgett, 2005).

Posteriorment als nostres estudis, s'han descrit dues quinases més capaces d'induir la fosforilació d'Akt en Ser473: mTORC2 i DNA-PK (Feng *et al.*, 2004; Sarbassov *et al.*, 2005). Sembla que mTORC2 fosforila Akt en condicions de creixement i estimulació per mitògens, mentre que DNA-PK ho faria en condicions d'estrès, com per exemple després de dany a l'ADN en presència de CpG ADN (Bozulic *et al.*, 2009). A més, aquests estudis suggereixen que la regulació d'Akt per diferents quinases afecta als substrats que s'activen. Els nostres resultats descarten que aquestes quinases siguin les responsables de la fosforilació d'Akt induïda per PMA, ja que s'ha descrit que la fosforilació d'Akt que indueixen és inhibible per LY294002. Però repassant les nostres dades, podria ser que mTORC2 o DNA-PK fos la PDK2 basal, responsable de la fosforilació d'Akt en aquells pacients on aquesta fosforilació és inhibible per LY294002.

Hem comprovat que tant el LY294002 com el Bis I indueixen apoptosi en les cèl·lules de LLC. Però sorprenentment, la inhibició de l'activitat d'Akt induïda per PKC β no afecta la viabilitat de les cèl·lules de LLC. Aquests resultats indiquen que l'activitat d'Akt no és essencial per l'efecte de supervivència induït per l'activació de PKC i que altres vies induïdes per PKC són suficients per mantenir la viabilitat de les cèl·lules de LLC. Els nostres resultats coincideixen amb els d'altres grups, on utilitzant inhibidors diferents del LY33531 per bloquejar PKC β , tampoc veuen apoptosi en cèl·lules de LLC (Abrams *et al.*, 2007).

Recentment s'ha descrit que la isoforma de PKC implicada en la supervivència de les cèl·lules de LLC és PKC δ , que senyalitza per sota de Syk (quinasa constitutivament activa en LLC) i que regula MCL-1 per una via dependent de proteasoma, a través de la fosforilació d'Akt sobre GSK3, que bloqueja la seva activitat. També han vist que aquesta regulació de MCL-1 dependent de PKC δ es dona en mostres sense fosforilació d'Akt, és a dir, via GSK3-PKC directa (Baudot *et al.*, 2009). Així doncs, PKC δ podria ser una isoforma de PKC implicada en la supervivència de les cèl·lules de LLC, tant basal com induïda per PMA, però degut a la falta d'inhibidors específics no podem aclarir quin paper desenvolupa en les cèl·lules de LLC.

Si l'activació d'Akt és essencial per l'efecte de supervivència induït per SDF-1 α i IL-4, de moment es desconeix. Tot i que la inhibició de PI3K bloqueja l'efecte de supervivència de IL-4, el LY294002 induïx apoptosi en cèl·lules criopreservades amb Akt defosforilada (Barragan *et al.*, 2002) suggerint l'existència d'altres vies de supervivència crítiques per sota de PI3K. Fins fa poc es desconeixia quina podia ser aquesta via, però recentment s'ha descrit que la SGK3 és capaç de mantenir la viabilitat cel·lular de manera dependent de PI3K i PDK1, però independent d'Akt, en cèl·lules amb una activitat baixa d'Akt. Com que és dependent de PI3K, és inhibible per LY294002 (Vasudevan *et al.*, 2009). Això explicaria perquè en cèl·lules de LLC sense activitat basal d'Akt, el LY294002 té efecte en la viabilitat.

Finalment, Bis I però no l'inhibidor de PKC β LY33531, té efectes additius en combinació amb l'inhibidor de PI3K LY294002. Això suggereix que quan la PKC β està inhibida hi ha altres vies dependents de PKC que es mantenen actives en les cèl·lules de LLC.

La fosforilació d'Akt mitjançada per PKC és independent de PI3K en les cèl·lules de LLC i en les cèl·lules T normals, però sorprenentment aquesta fosforilació depèn de PI3K en cèl·lules B normals. La raó d'aquesta diferència és desconeguda. Una possibilitat és que les cèl·lules de LLC hagin perdut la seva dependència durant la transformació. Una segona possibilitat és que aquesta sigui una característica de les cèl·lules B normals a partir de les que la LLC es desenvolupa. De fet, les cèl·lules B de LLC expressen CD5 i ZAP-70, dues proteïnes que s'expressen en cèl·lules T normals però no en cèl·lules B (Chiorazzi *et al.*, 2005). La comprensió d'aquesta diferència entre cèl·lules de LLC i limfòcits B normals podria ser explotada en un futur per aconseguir teràpies més específiques i selectives.

Hem caracteritzat, mitjançant la tècnica del RT-MLPA quins són els gens relacionats amb l'apoptosi que es modulen després del tractament amb els diferents inhibidors. Així, hem vist que la inhibició de PI3K, tant amb LY294002 com amb wortmanina, té pocs efectes transcripcionals. El tractament amb Bis I modula alguns gens, però tampoc indueix grans canvis transcripcionals en els gens relacionat amb l'apoptosi. Després del tractament de les cèl·lules de LLC amb PMA sí que s'observen grans canvis en els gens estudiats per RT-MLPA. Tot i que es donen grans augments en gens proapoptòtics, com *NOXA* i *BAX*, segurament els augments encara més grans que es donen en gens antiapoptòtics, com *BFL-1* i *MCL-1*, fan que el resultat final sigui la protecció de les cèl·lules de l'apoptosi espontània.

En conclusió, aquests resultats i aquells prèviament publicats indiquen que les cèl·lules de LLC tenen dues vies de senyalització convergents per fosforilar i activar Akt (Figura D.1). La primera via és PI3K dependent i correspon a la via clàssica d'activació d'Akt descrita en molts models. Aquesta via és activada per unió al BCR (Bernal *et al.*, 2001), albúmina (Wickremasinghe *et al.*, 2001), IL-4 (Barragan *et al.*, 2002), àcid lisofosfatídic (Hu *et al.*, 2005), i el SDF-1 α (Nishio *et al.*, 2005) en cèl·lules de LLC i inclou PDK1 i probablement la recent identificada Ser473 quinasa, el complex Rictor-mTOR (Sarbasov *et al.*, 2005). La segona via depèn de PKC β i és independent de PI3K i contribueix a l'activitat basal constitutiva d'Akt present en les cèl·lules de LLC. Finalment, aquests resultats suggereixen que múltiples i redundants vies estan implicades en la supervivència de les cèl·lules de LLC i que és necessari analitzar la complexa xarxa de vies de supervivència per tal de seleccionar les millors dianes terapèutiques.

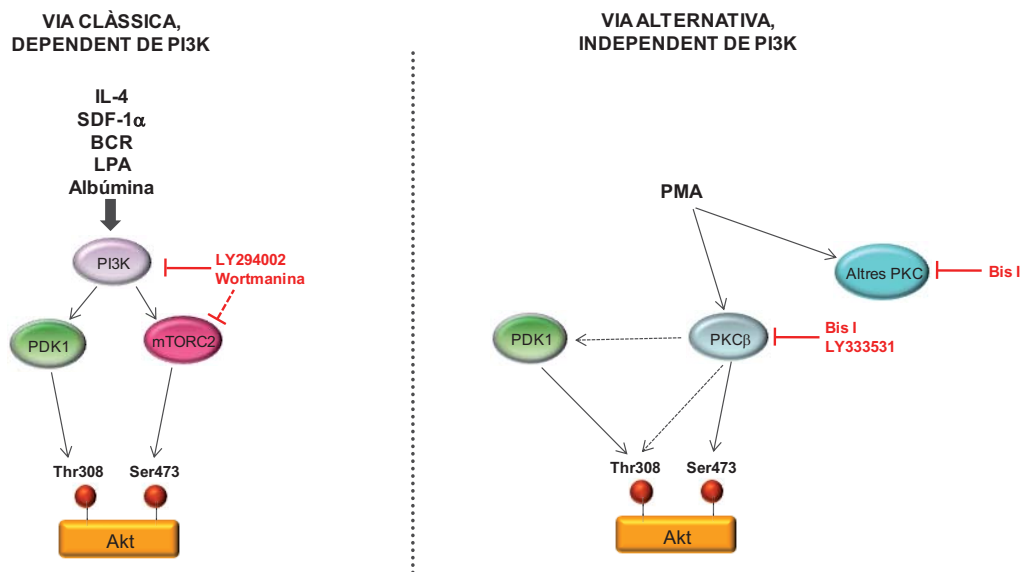


Figura D.1. Esquema de les vies de la xarxa de senyalització PKC/PI3K/Akt en cèl·lules de LLC.

EFFECTE DELS INHIBIDORS D'AKT EN LES CÈL·LULES DE LLC

En el primer capítol d'aquesta memòria hem descrit que Akt es troba fosforilada i activa en les cèl·lules de LLC. En el segon capítol hem analitzat l'efecte de la inhibició d'Akt en la viabilitat de les cèl·lules de LLC, utilitzant dos inhibidors, Akti-1/2 i A-443654. Hem comprovat que tots dos inhibidors induïen apoptosi en les cèl·lules primàries de LLC, i aquest efecte és independent del grau d'expressió de CD38 i ZAP-70.

She i col·laboradors han descrit que la inhibició d'Akt amb Akti-1/2 en línies de càncer de mama amb mutacions de PI3K i/o amplifícacions d'HER2 inhibeix la proliferació cel·lular, mentre que el mateix tractament no té cap efecte en les línies cel·lulars amb PI3K/PTEN *wild type* i expressió d'HER2 normal (She *et al.*, 2008). És a dir, que els tumors amb fosforilació constitutiva d'Akt són més sensibles a la seva inhibició que els tumors sense Akt fosforilada basalment. Aquesta hipersensibilitat a la inhibició d'Akt suggereix que aquests tumors són "addictes" a la senyalització per PI3K/Akt. L'"addicció oncogènica" és va descriure gràcies a la observació que la inhibició de la oncoproteïna en cèl·lules transformades tenia molts més efectes i molt més profunds que la inhibició de la corresponent proteïna *wild type* en la cèl·lula parenteral no transformada (Weinstein, 2002). Així, hem estudiat si hi havia diferent sensibilitat a la inhibició d'Akt entre les cèl·lules de LLC que tenien o no Akt fosforilada, és a dir, cèl·lules fresques i criopreservades. Ja que podríem esperar que les cèl·lules criopreservades, al tenir menys fosforilació i per tant, menys activitat d'Akt (tal i com hem descrit al capítol 1), fossin més resistents a l'apoptosi induïda pels inhibidors. Hem trobat petites diferències, i les cèl·lules fresques, amb més Akt fosforilada, són lleugerament més sensibles al tractament amb Akti-1/2, però aquestes diferències no són estadísticament significatives. En el tractament amb A-443654, les diferències en la viabilitat són pràcticament nul·les entre cèl·lules fresques i criopreservades. Llavors, perquè la inhibició d'Akt també induïx apoptosi en les cèl·lules criopreservades de LLC? Una hipòtesi és que la tècnica que estem utilitzant per detectar l'activitat d'Akt, el Western blot en els residus Ser473 i Thr308, tot i ser la tècnica més utilitzada, no sigui prou sensible per detectar petites quantitats d'Akt activa. I que en les cèl·lules de LLC, amb poca quantitat d'Akt fosforilada, ja hi hagi suficient per induir apoptosi a l'inhibir-la. Una altra possibilitat és que aquesta diferència en la sensibilitat a la inhibició d'Akt sigui independent d'Akt. És a dir, que les cèl·lules fresques, per motius que encara desconeixem, siguin més sensibles que les cèl·lules criopreservades a la inhibició d'Akt, i potser, també siguin més sensibles a altres tractaments. L'última explicació seria que els inhibidors utilitzats tinguessin altres dianes inespecífiques, importants per la viabilitat tant en les cèl·lules fresques com criopreservades.

Així doncs, hem confirmat que Akt juga un paper molt important en la supervivència de les cèl·lules de LLC. Aquests resultats concorden amb l'article publicat recentment on es descriu que la introducció d'una forma constitutivament activa d'Akt, la myr.Akt, augmenta la viabilitat de les cèl·lules de LLC (Longo *et al.*, 2008). A més, recentment, altres autors han confirmat la

importància d'Akt en la supervivència de cèl·lules de LLC utilitzant els mateixos compostos, Akti-1/2 i A-443654 (Zhuang *et al.*, 2009).

El mecanisme d'acció de tots dos inhibidors és diferent. Mentre que el A-443654 és un inhibidor competitiu d'ATP (Luo *et al.*, 2005; Shi *et al.*, 2005) i produeix una hiperfosforilació d'Akt (Okuzumi *et al.*, 2009), l'Akti-1/2 és un inhibidor al·lostèric no competitiu d'ATP (Calleja *et al.*, 2009). Sorprenentment, Akti-1/2 no indueix cap canvi en el perfil de RT-MLPA. De la mateixa manera, els inhibidors generals de PI3K, LY294002 i wortmanina, tampoc indueixen grans canvis en els nivells transcripcionals dels gens relacionats amb l'apoptosi estudiats per RT-MLPA. En la bibliografia ja hi ha casos on la inhibició o desaparició d'Akt no afecta als nivells transcripcionals de gens relacionats amb apoptosi. Per exemple, s'ha descrit que els timòcits del ratolí *knock-out* d'Akt1 no s'afecta la transcripció de cap membre de la família de BCL-2 respecte el ratolí *wild type* (Kiesling *et al.*, 2007). Akt modula l'activitat transcripcional del factor de transcripció FoxO3a, fosforilant-lo i provocant la seva migració del nucli al citosol, on és degradat per unió a proteïnes 14-3-3 (Brunet *et al.*, 1999). Per tant, la inhibició d'Akt, activaria FoxO3a, induint canvis en els nivells d'ARNm de les seves dianes, com *BIM* (Dijkers *et al.*, 2000) i *PUMA* (You *et al.*, 2006). Però els experiment de RT-MLPA suggereixen que la inhibició d'Akt i conseqüentment, la defosforilació de FoxO3a induïda per Akti-1/2 no és suficient per induir la transcripció de *BIM* i *PUMA* en les cèl·lules de LLC. Com que A-443654 és un inhibidor d'Akt menys específic (Bain *et al.*, 2007), el model més simple per explicar els canvis que indueix en el perfil de RT-MLPA, seria considerar que la inhibició d'Akt no indueix cap canvi en el perfil de RT-MLPA, i per tant, la inhibició de les dianes addicionals d'A-443654 explicaria els seus efectes en els nivells dels ARNm. Així, A-443654 indueix un augment en els nivells de la proteïna p53 i una inducció dels nivells de missatger de *PUMA*, una diana transcripcional de *TP53* en les cèl·lules de LLC (Mackus *et al.*, 2005; Coll-Mulet *et al.*, 2006). D'acord amb aquests resultats, la inducció de l'ARNm de *PUMA* per A-443654 va disminuir en les mostres de pacients amb *TP53* delecionat/mutat. De manera interessant, Akti-1/2 va induir les proteïnes PUMA i NOXA sense afectar als ARNm *PUMA* i *NOXA*. El mecanisme per aquests efectes és desconegut, i podria ser explicat per un augment de la traducció o una disminució en la proteòlisi d'aquestes proteïnes.

Un efecte comú de tots dos inhibidors d'Akt és la modulació del balanç NOXA/MCL-1. S'ha descrit que en cèl·lules primàries de LLC, la majoria de proteïna NOXA està associada amb MCL-1 (Hallaert *et al.*, 2007). Així, el tractament amb Akti-1/2 i A-443654 va induir un augment en els nivells de NOXA i una caiguda en els nivells de MCL-1, una proteïna essencial per la supervivència de les cèl·lules de LLC. A més, la inhibició de les caspases amb ZVAD.fmk va prevenir la disminució en els nivells de MCL-1 induïda per Akti-1/2, suggerint que el clivellament de MCL-1 podria participar en un circuit d'amplificació que augmentaria l'alliberament de citocrom *c* i l'apoptosi en les cèl·lules de LLC, tal i com s'ha descrit pels inhibidors de PKC (Snowden *et al.*, 2003). D'acord amb els nostres resultats, la introducció d'una forma constitutivament activa d'Akt augmenta la proteïna MCL-1, i la inhibició de MCL-1 amb

tractament amb siRNA indueix apoptosi en les cèl·lules de LLC (Longo *et al.*, 2008). El mecanisme de regulació de MCL-1 per Akt és desconegut. S'ha descrit que el substrat d'Akt GSK-3 pot induir la desestabilització de la proteïna MCL-1 (Maurer *et al.*, 2006). Però la inhibició de GSK-3 no inhibeix l'efecte apoptòtic dels inhibidors de PI3K (Plate, 2004). Com que GSK-3 és inhibida per PKC (Christian *et al.*, 2002), potser la sobreexpressió de PKC β II (Abrams *et al.*, 2007) bloqueja aquesta via en les cèl·lules de LLC.

Els nostres resultats indiquen que les cèl·lules B de LLC són més sensibles als inhibidors d'Akt que les cèl·lules T de LLC i que els limfòcits B i T de donants sans. Els fàrmacs quimioterapèutics, com la fludarabina, el clorambucil i la doxorubicina, indueixen apoptosi de manera igual en els limfòcits B i T, donant lloc a la immunosupressió (Keating, 1993; Hamblin *et al.*, 2008). Per això, l'efecte diferencial dels inhibidors Akti-1/2 i A-443654 en els limfòcits B i T és d'especial interès.

Tots dos inhibidors d'Akt són capaços d'induir apoptosi inclús en presència de senyals de supervivència, com IL-4 i SDF-1 α . Això tindrà importància de cara a futures teràpies dirigides contra la via de PI3K/Akt, ja que les senyals del microentorn de les cèl·lules de LLC *in vivo* juguen un paper molt important en el desenvolupament i manteniment de la LLC (Pleyer *et al.*, 2009). A més, hem comprovat que la inhibició d'Akt indueix apoptosi de manera independent de l'estat de TP53. Això és important per la teràpia dels pacients amb alteracions en la via de p53, ja que aquestes alteracions confereixen resistència a moltes de les teràpies actuals, entre elles el tractament amb agents alquilants i la fludarabina (Sturm *et al.*, 2003).

En conclusió, aquests resultats suggereixen que els inhibidors d'Akt sols o en combinació amb drogues quimioterapèutiques podrien ser una nova opció terapèutica pel tractament de la LLC.

EFFECTE DELS INHIBIDORS SELECTIUS DE LES ISOFORMES DE PI3K EN LES CÈL·LULES DE LLC

En el capítol 3 hem analitzat la contribució de cada una de les isoformes de classe I de PI3K en la supervivència de les cèl·lules de LLC, utilitzant una bateria d'inhibidors selectius per les quatre isoformes (p110 α , p110 β , p110 δ i p110 γ).

Els nostres resultats indiquen que la inhibició de p110 α , p110 β o p110 δ indueix apoptosi mentre que la inhibició de p110 γ no afecta a la viabilitat de les cèl·lules de LLC, suggerint que p110 α , p110 β i p110 δ , contribueixen a mantenir la viabilitat basal de les cèl·lules de LLC. A priori, aquest resultat ens va resultar sorprenent, ja que tenint en compte la bibliografia prèvia en altres leucèmies (àmpliament descrit en la Introducció), esperàvem que la inhibició de p110 δ fos la que tingués més efecte. Els nostres resultats han estat confirmats per un altre grup, que recentment ha publicat resultats similars utilitzant uns altres inhibidors selectius de p110 α (PIK90 and PI103) i els mateixos inhibidors per les isoformes p110 β i p110 δ (Niedermeier *et al.*, 2009).

Degut a la falta d'anticossos específics comercials, no hem pogut analitzar l'expressió de cada una de les isoformes de PI3K en les cèl·lules de LLC. Per tant, desconeixem els nivells d'expressió de cada una de les isoformes de PI3K de classe I en els limfòcits de LLC. Es coneix que les isoformes de PI3K poden tenir diferents funcions biològiques dependent del tipus cel·lular estudiat, segons els nivells d'expressió de cada una de les isoformes. Per exemple, la migració cel·lular depèn de p110 δ en cèl·lules tumorals de mama (Sawyer *et al.*, 2003), però en cèl·lules endotelials, que no expressen p110 δ , la migració és dependent de p110 α (Hill *et al.*, 2000). En la leucèmia mieloide aguda (LMA) i la leucèmia promielocítica aguda (LPA), on la viabilitat de les cèl·lules leucèmiques és majoritàriament dependent de p110 δ , aquesta és la isoforma més expressada (Billottet *et al.*, 2006; Billottet *et al.*, 2009). S'ha descrit que en limfòcits B normals p110 δ és responsable del 60% de l'activitat total PI3K mentre que p110 α i p110 β només representen el 40% de l'activitat remanent (Bilancio *et al.*, 2006), i p110 δ és la isoforma majoritàriament involucrada en senyalització per IL-4 i el receptor de cèl·lules B en limfòcits B normals (Bilancio *et al.*, 2006). Així, una primera possibilitat seria considerar que el paper de cada una de les isoformes fos dependent dels nivells d'expressió de cada una d'elles, i que per tant, en limfòcits de LLC les isoformes més expressades fossin p110 α , p110 β i p110 δ , i que la inhibició d'aquestes tres isoformes induiria apoptosi, tal i com demostren els nostres resultats.

També hem de considerar una segona possibilitat: que els nivells d'expressió de les isoformes de PI3K en LLC siguin els mateixos que en les cèl·lules B normals, i que per tant, la sensibilitat a la inhibició de p110 α , p110 β i p110 δ no estigui relacionada amb el nivell d'expressió. S'ha descrit que en un mateix tipus cel·lular diferents funcions dependents de PI3K poden estar regulades per diferents isoformes, independentment dels nivells d'expressió. Per exemple, en

mastòcits, la isoforma implicada en la resposta dependent d'antigen és p110 δ , mentre que aquesta isoforma és menys important en la fagocitosi mitjançada per FcyRs, on p110 β sembla que és la isoforma més important (Leverrier *et al.*, 2003). Així, si assumim que les cèl·lules de LLC tenen els mateixos nivells d'expressió que les cèl·lules B normals (p110 δ com a isoforma majoritària), podríem considerar que això es podria estar donant en les cèl·lules de LLC, i que per tant, la viabilitat basal, o la resposta als factors externs que regulen aquesta viabilitat basal, estaria regulada majoritàriament per p110 α , p110 β i p110 δ .

Els nostres resultats mostren que hi ha pacients de LLC resistents a l'apoptosi induïda pels inhibidors de PI3K. Aquesta resistència a la inhibició de la via de PI3K ha estat descrita en altres leucèmies. Billottet i col·laboradors han demostrat que en LMA existeix un subgrup de pacients resistents a la inhibició de p110 δ , utilitzant l'inhibidor IC87114 (AS606509), i aquesta resistència no s'explica pels nivells d'expressió de p110 δ (Billottet *et al.*, 2006). A més a més, el fet que aquests pacients resistents a l'apoptosi induïda per la inhibició de PI3K ho siguin a tots els inhibidors, inclús al LY294002, suggereix que altres vies de supervivència estan activades per mantenir la viabilitat basal. Caldrà considerar especialment aquests pacients resistents en el cas que s'arribin a administrar teràpies dirigides a la via de PI3K.

Els experiments de combinació dels inhibidors selectius de les isoformes de PI3K ens mostren que la combinació de tots tres inhibidors és la condició que disminueix més la viabilitat, i aquesta disminució és pràcticament igual a l'observada amb el tractament amb el LY294002. Això indica que tot i que el LY294002 és un inhibidor força inespecífic (Bain *et al.*, 2007), els efectes que veiem en les cèl·lules de LLC són PI3K-dependents. Si comparem l'apoptosi induïda per la combinació dels tres inhibidors amb l'apoptosi de la combinació de AS702630 i AS606565, es pot veure que l'addició del compost AS606509 no augmenta la caiguda de la viabilitat. Aquest resultat confirma el que havíem vist amb la incubació amb els inhibidors sols: p110 α i p110 δ són les isoformes que participen majoritàriament en el manteniment de la viabilitat basal, i p110 β contribueix en un menor grau.

Els nostres resultats mostren que les cèl·lules B són més sensibles que les cèl·lules T a la inhibició de PI3K, i com ja hem comentat anteriorment, aquesta diferència entre cèl·lules B i T és d'especial interès de cara a futures teràpies. Una hipòtesi per explicar les diferències entre cèl·lules B i T seria que les cèl·lules T expressen menys quantitat de PI3K, i per tant són menys sensibles a la inhibició d'aquesta via. Altres vies de supervivència estarien mantenint la viabilitat cel·lular. Una altra possible explicació seria que les senyals de l'entorn cel·lular, com CXCR4, estarien activant la via de PI3K en cèl·lules B però no en cèl·lules T.

A l'estudiar l'efecte dels inhibidors selectius de PI3K en cèl·lules de LLC i en cèl·lules de donants sans hem vist que hi ha petites diferències en la resposta a aquests inhibidors entre les cèl·lules B normals i les cèl·lules B de LLC. Tal i com hem discutit prèviament, la falta d'anticossos específics comercials per la detecció de les isoformes ens impedeix estudiar si aquestes diferències en la resposta correlacionen amb diferències en l'expressió de les

isoformes. Independentment dels nivells d'expressió, podríem considerar que hi ha hagut un canvi d'importància de les isoformes de PI3K en cèl·lules tumorals respecte les cèl·lules normals. En alguns tipus cel·lulars, s'ha descrit que el grau de participació de cada una de les isoformes de PI3K en determinades funcions cel·lulars varia en cèl·lules transformades respecte cèl·lules primàries, tot i presentar els mateixos nivells d'expressió de les isoformes de PI3K. Per exemple, Bilancio i col·laboradors han descrit que la senyalització per activació de BCR en limfòcits primaris depèn majoritàriament de la isoforma p110 δ ja que l'inhibidor IC87114 bloqueja la senyalització per BCR, mentre que en limfòcits transformats WEHI-231, la senyalització del BCR no és inhibida per IC87114 ni per AS604850 (inhibidors de p110 γ) però sí per LY294402, suggerint la participació de p110 α i/o β en aquesta via (Bilancio *et al.*, 2006). Un mecanisme similar s'ha descrit per macròfags transformats (Papakonstanti *et al.*, 2008), on la síntesi de ADN en resposta a CSF-1 és dependent de p110 α , contràriament al que s'observa en macròfags primaris, on aquesta resposta és dependent de p110 δ . Així doncs, sembla que en cèl·lules transformades la isoforma p110 δ perd importància, i la p110 α en guanya. Sembla que això és el que està passant en les cèl·lules de LLC, ja que els nostres resultats mostren que són més sensibles a la inhibició de p110 α i menys sensibles a la inhibició de p110 β i p110 δ que els limfòcits B normals. Aquests resultats són preliminars i s'hauria d'estudiar amb més profunditat.

Hem estudiat els efectes de la combinació dels inhibidors selectius de PI3K i Nutlina-3a en pacients de LLC amb TP53 *wt*, i hem comprovat que la combinació d'aquests inhibidors té lleugers efectes additius. En altres leucèmies s'han descrit efectes additius i inclús sinèrgics al combinar inhibidors de PI3K i Nutlina-3a, com en LMA (Kojima *et al.*, 2008). Sabem que Nutlina-3a estabilitza p53 i indueix l'expressió de *PUMA* i *BAX* en cèl·lules de LLC (Coll-Mulet *et al.*, 2006). Així, un possible mecanisme per explicar aquest efecte additiu seria que la inhibició de PI3K, a través de la inhibició d'Akt, facilitaria l'apoptosi mitjançada per BAX, ja que Akt inhibeix l'activitat proapoptòtica de BAX (Parcellier *et al.*, 2008). A més, Akt fosforila i activa MDM2, augmentant la seva activitat (Parcellier *et al.*, 2008). Per tant, inhibint PI3K estaríem facilitant l'activitat de Nutlina-3a.

També hem caracteritzat, mitjançant la tècnica del RT-MLPA quins són els gens relacionats amb l'apoptosi que es modulen després de la incubació amb els inhibidors de PI3K. D'acord amb els resultats dels dos capítols anteriors, la inhibició de la via de PI3K pràcticament no té efectes transcripcionals, de manera que a l'incubar les cèl·lules de LLC amb els inhibidors de les isoformes de PI3K no s'observen diferències significatives en els nivells d'expressió de missatger dels gens estudiats.

Si comparem aquests resultats amb els resultats obtinguts amb els inhibidors d'Akt, veiem que la inhibició d'Akt indueix més apoptosi en les cèl·lules de LLC que la inhibició de PI3K. *A priori*, no és el resultat que esperàvem, ja que PI3K està per sobre d'Akt en la cascada de senyalització, i té altres dianes que podrien estar regulant la viabilitat, com SGK3 (Vasudevan

et al., 2009). Encara que considerem que en les cèl·lules de LLC la diana principal de PI3K pel que fa a viabilitat és Akt, la inhibició de PI3K hauria d'induir una major apoptosi que la inhibició selectiva d'una de les seves dianes.

S'ha descrit que cal inhibir en més d'un 95% l'activitat PI3K per poder veure efectes sobre l'activitat d'Akt (Engelman, 2009). Com que no disposem de les eines necessàries per quantificar l'activitat PI3K en les cèl·lules de LLC, desconeixem quin percentatge d'inhibició de l'activitat causa el tractament de les cèl·lules amb els inhibidors de PI3K. Així doncs, podria ser que amb els inhibidors de PI3K no arribéssim a bloquejar completament l'activitat PI3K, i que per tant, aconseguim efectes majors al bloquejar directament la quinasa que regula principalment la viabilitat en les cèl·lules de LLC, és a dir, Akt. A més, altres vies independents de PI3K poden estar regulant l'activitat d'Akt, i ser més importants que PI3K en el manteniment de la viabilitat cel·lular (per exemple, mTORC2).

La contribució de les isoformes de PI3K en la senyalització i la biologia cel·lular poden variar significativament en cèl·lules primàries o immortalitzades. El paper predominant que juga p110 δ en leucòcits primaris suggereix que els inhibidors amb selectivitat per p110 δ seran d'utilitat en patologies inflamatòries i autoimmunes. En càncer però, una inhibició més àmplia de les isoformes de PI3K, especialment de p110 α podria ser crucial per una òptima resposta a la teràpia. De fet, ja hi ha inhibidors que estan en assajos clínics pel tractament de la LLC, com el CAL-101, inhibidor de p110 δ de Calistoga Pharmaceuticals Inc. (www.clinicaltrials.gov, NCT00710528, Flinn, 2009).

Els nostres resultats suggereixen que els inhibidors selectius de PI3K poden ser una eina terapèutica prometedora per la teràpia de la LLC, capaços de revertir la resistència a l'apoptosi amb escassa toxicitat per les cèl·lules T, tant en monoteràpia com en combinació amb les drogues que configuren la teràpia estàndard actual, d'una manera molt més selectiva i eficient.

EFFECTES DELS ALQUILFOSFOLÍPIDS EDELFOFINA I PERIFOSINA EN LES CÈL·LULES DE LLC

En aquest estudi hem descrit la capacitat d'inducció d'apoptosi d'edelfosina i perifosina en les cèl·lules de LLC. Tots dos alquilfosfolípids (ALPs) indueixen apoptosi en les cèl·lules de LLC, tot que a unes concentracions superiors a les descrites per altres tipus cel·lulars, com les cèl·lules Jurkat (Gajate *et al.*, 2009a).

Un dels mecanismes d'acció dels ALPs en cèl·lules de diferents leucèmies és la inhibició de la fosforilació i activitat d'Akt (Kondapaka *et al.*, 2003; Hideshima *et al.*, 2006). Hem estudiat els efectes d'edelfosina i perifosina en la fosforilació basal d'Akt, i la induïda pels factors de supervivència PMA i SDF-1 α en les cèl·lules de LLC. En cap cas, després d'una incubació de 6 hores, els ALPs van ser capaços d'inhibir la fosforilació d'Akt en Ser473. Encara no hem comprovat si a temps més llargs d'incubació, edelfosina i perifosina inhibeixen la fosforilació d'Akt en cèl·lules de LLC, i per tant, de moment no podem descartar la implicació de la via d'Akt en el mecanisme d'acció dels ALPs en les cèl·lules de LLC.

Un altre mecanisme d'acció dels ALPs és a través dels receptors de mort en els *lipids rafts*, que actuen acoblant el receptor de Fas/CD95 i les molècules de senyalització que són reclutades per induir apoptosi (Gajate *et al.*, 2004; Gajate *et al.*, 2005; Gajate *et al.*, 2007; Gajate *et al.*, 2009a; Gajate *et al.*, 2009b). Aquests complexos es poden formar com a resposta a la interacció de CD95L amb el seu lligand natural CD95, però també a través d'agents no fisiològics de manera independent del lligand (Gajate *et al.*, 2001; Mollinedo *et al.*, 2006). Hem estudiat els nivells d'expressió dels receptors de mort en la membrana cel·lular de les cèl·lules de LLC, i hem comprovat que els nivells d'expressió i la intensitat de fluorescència mitja són molt variables entre pacients. S'ha descrit que les cèl·lules de LLC presenten defectes en la resposta a l'apoptosi induïda per l'estimulació de Fas/CD95 i TRAIL (Plumas *et al.*, 1998; MacFarlane *et al.*, 2002; Romano *et al.*, 2005), i alguns autors suggereixen que aquesta resistència és deguda a defectes en molècules situades per sota del receptor en la cascada apoptòtica (Proto-Siqueira *et al.*, 2008). Aquests defectes, explicarien perquè les cèl·lules de LLC, tot i expressar receptors de mort són més resistents que altres tipus cel·lulars a l'apoptosi induïda pels ALPs.

També hem estudiat el seu efecte diferencial dels ALPs sobre les cèl·lules B i cèl·lules T. Hem comprovat com les cèl·lules B CD19⁺ són més sensibles que les cèl·lules T CD3⁺ a la inducció d'apoptosi mitjançada per aquests dos ALPs. Aquest efecte diferencial no és sorprenent, ja que ja havia estat descrit entre cèl·lules tumorals i normals per edelfosina (Mollinedo *et al.*, 1997). Posteriorment a la realització d'aquesta part de l'estudi amb els ALPs, (Beneteau *et al.*, 2008) altres autors han descrit la resistència de les cèl·lules mononucleades de sang perifèrica a l'apoptosi induïda per edelfosina. La majoria de drogues efectives en la LLC indueixen apoptosi en les cèl·lules T normals conduint a immunosupressió (Hamblin *et al.*, 2008). Per això, l'efecte

diferencial d'edelfosina i perifosina és de gran interès pel desenvolupament de teràpies més selectives.

També hem caracteritzat, mitjançant la tècnica del RT-MLPA quins són les gens relacionats amb l'apoptosi que s'activen després de la incubació amb edelfosina i perifosina. Edelfosina induïx un augment en els nivells de *NOXA* i *PUMA*, mentre que perifosina no afecta a la transcripció dels gens estudiats per RT-MLPA.

Finalment, els nostres resultats, junt amb els resultats dels grups del Dr. Faustino Mollinedo i de la Dra. Dolors Colomer, seran publicats en breu a la revista *Clinical Cancer Research*. En aquest article, es demostra que edelfosina (de manera més potent) i perifosina induïxen apoptosi en cèl·lules de LLC a través del complex de Fas/CD95 i *lipid rafts*. A més, en un model xenograf murí, es demostra que l'edelfosina s'acumula de manera preferencial al tumor i n'indueix la regressió. En resum, es demostra la implicació dels *lipids rafts* en la mort induïda per edelfosina i perifosina en cèl·lules de LLC, i que a més, edelfosina té una acció selectiva en cèl·lules tumorals *in vivo*. Això, dóna una prova de concepte per la futura avaluació clínica d'edelfosina, i suggereix una nova opció terapèutica pel tractament de la LLC.

DISCUSSIÓ GENERAL I PERSPECTIVES FUTURES

Les cèl·lules de LLC en sang perifèrica presenten una resistència anòmala a la inducció d'apoptosi, i reben senyals del microentorn cel·lular que afavoreixen la seva supervivència (Pleyer *et al.*, 2009). En un gran percentatge de malalts no s'aconsegueix controlar la malaltia amb les teràpies convencionals, i en molts altres apareixen recaigudes i resistències al tractament, sobretot degudes a alteracions en la via de p53. A més, la majoria de tractaments no són selectius per les cèl·lules tumorals, provocant problemes d'immunosupressió. Per tant, és necessari identificar nous agents amb toxicitat selectiva per les cèl·lules B malignes, que utilitzin mecanismes d'acció diferents als coneguts i que sobrepassin la via de p53.

En aquesta tesi doctoral ens vam plantejar estudiar una de les vies de supervivència més alterades en càncer, i que ja havia demostrat que jugava un paper en la supervivència de les cèl·lules de LLC (Barragan *et al.*, 2002). Així, els objectius inicials d'aquesta tesi, van ser caracteritzar la xarxa de PKC/PI3K/Akt, i els efectes de la seva inhibició en les cèl·lules de LLC.

Quan vam començar a realitzar els experiments que han donat lloc a aquesta tesi, no disposàvem d'inhibidors selectius per Akt o per PI3K. A més, degut a les dificultats tècniques per utilitzar ARN d'interferència en les cèl·lules de LLC, no podíem estudiar el paper de PI3K o Akt en les cèl·lules de LLC per silenciament genètic. Afortunadament, han anat sorgint compostos específics, tant per Akt (Akti-1/2) com per PI3K (inhibidors selectius classe I), i gràcies a aquestes eines hem pogut estudiar quin paper juguen PI3K i Akt en les cèl·lules de LLC.

En primer lloc, hem comprovat que existeixen dues vies de senyalització convergents en les cèl·lules de LLC. La primera, dependent de PI3K, present de manera basal en les cèl·lules de LLC i activada per factors de supervivència com la IL-4 i el SDF-1 α ; i una segona, dependent de PKC, també present de manera basal en les cèl·lules de LLC i activada per PMA. En aquesta via, PKC β juga un paper important en la fosforilació i activació d'Akt.

Hem comprovat com la inhibició de la via, amb inhibidors generals de PKC (Bis I), inhibidors generals de PI3K (LY294002 i wortmanina), inhibidors selectius de les isoformes de PI3K classe I, o inhibidors d'Akt (Akti-1/2 i A-443654), indueix apoptosi en les cèl·lules de LLC. Aquesta inducció de mort cel·lular es dona inclús en presència de senyals de supervivència (IL-4, SDF-1 α , PMA) i en pacients amb delecions 17p o mutacions en p53. Això confirma que aquesta via juga un paper clau en la supervivència de les cèl·lules leucèmiques de LLC.

A més, les cèl·lules B de LLC són més sensibles a la inhibició d'aquesta via que les cèl·lules T normals, i en alguns casos, inclús que les cèl·lules B normals (com en el cas del tractament amb Akti-1/2). Aquesta "addició oncogènica" de les cèl·lules tumorals a la via de PI3K/Akt, ja s'ha descrit en altres càncers, on s'ha demostrat que les teràpies contra PI3K/Akt indueixen més mort cel·lular en les cèl·lules amb més activitat de la via, com són les cèl·lules tumorals (Weinstein, 2002). Així, una vegada més, comprovem que la via d'Akt és d'especial importància

DISCUSSIÓ

per aquestes cèl·lules leucèmiques, i que la seva inhibició és d'especial interès per aconseguir noves teràpies més selectives, que evitin els efectes secundaris immunosupressors.

En conjunt, els resultats obtinguts en aquesta tesi doctoral aporten nous coneixements sobre les vies de supervivència i d'inducció d'apoptosi de les cèl·lules de LLC, i demostren que la inhibició de la via PKC/PI3K/Akt és una prometedora via d'intervenció terapèutica pel tractament de la LLC.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS.

1. En les cèl·lules de LLC existeixen dues vies de senyalització convergents per fosforilar i activar Akt. La primera, és dependent de PI3K, i correspon a la via clàssica d'activació d'Akt. Contribueix en la fosforilació basal present en la majoria de cèl·lules fresques de LLC i en la induïda per la IL-4, el SDF-1 α i l'activació del BCR. La segona via, és independent de PI3K i dependent de PKC. Contribueix a l'activitat basal constitutiva d'Akt present en algunes mostres fresques de LLC, i és activada pel tractament amb PMA. PKC β participa en la fosforilació i activació d'Akt en aquesta via.

2. Els inhibidors d'Akt, Akti-1/2 i A-443654, indueixen apoptosi en les cèl·lules de LLC, inclús en presència de senyals de supervivència, mitjançant mecanismes diferents. L'inhibidor més específic d'Akt, l'Akti-1/2, indueix un augment en les proteïnes proapoptòtiques NOXA i PUMA i una caiguda en la proteïna antiapoptòtica MCL-1. A més, el seu efecte és independent de p53.

3. La inhibició de les isoformes de classe I de PI3K p110 α , p110 β i p110 δ indueix apoptosi, mentre que la inhibició de p110 γ no afecta a la viabilitat de les cèl·lules de LLC. Hi ha mostres de LLC resistents a l'apoptosi induïda pels inhibidors selectius de les isoformes de classe I de PI3K.

4. Els alquilfosfolípids edelfosina i perifosina indueixen apoptosi en les cèl·lules de LLC, però no afecten a la fosforilació d'Akt basal ni a la induïda per PMA i SDF-1 α . Les cèl·lules de LLC expressen nivells variables de receptors de mort, i el seu nivell d'expressió no correlaciona amb l'apoptosi induïda pels alquilfosfolípids.

5. Les cèl·lules B de LLC són més sensibles que les cèl·lules T normals al tractament amb inhibidors d'Akt, amb inhibidors de PI3K i amb edelfosina i perifosina. A més, les cèl·lules B normals són més resistents que les cèl·lules B de LLC al tractament amb Akti-1/2. Aquests resultats suggereixen que els inhibidors de la via PI3K/Akt poden ser una eina terapèutica prometedora per la teràpia de la LLC, capaços de revertir la resistència a l'apoptosi amb escassa toxicitat per les cèl·lules T, tant en monoteràpia com en combinació amb les drogues que configuren la teràpia estàndard actual, d'una manera molt més selectiva i eficient.

PACIENTS, MATERIALS I MÈTODES

PACIENTS, MATERIALS I MÈTODES

1. RECOLLIDA DE MOSTRES.....	159
2. PURIFICACIÓ DE LEUCÒCITS MONONUCLEATS DE SANG PERIFÈRICA.....	159
2.1. PURIFICACIÓ DE CD19 ⁺	160
3. CRIOPRESERVACIÓ I DESCONGELACIÓ.....	161
4. CULTIU CEL·LULAR.....	162
5. SEGURETAT.....	162
6. ANÀLISI DE LA VIABILITAT CEL·LULAR.....	162
6.1. PROTOCOL ANEXINA V/IP.....	164
6.2. PROTOCOL CD3/CD19/ANEXINA V.....	165
6.3. PROTOCOL PER LA DETECCIÓ DEL PIC SUBDIPLOID.....	167
7. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ DE RECEPTORS DE MORT.....	167
8. ANÀLISI DE PROTEÏNES.....	168
8.1. EXTRACCIÓ DESNATURALIZANT D'EXTRACTES TOTALS.....	168
8.2. QUANTIFICACIÓ DE PROTEÏNES.....	168
8.3. ANÀLISI DE LES PROTEÏNES MITJANÇANT WESTERN BLOT.....	169
8.4. DESHIBRIDACIÓ DE MEMBRANES.....	170
9. OBTENCIÓ I ANÀLISI D'ARN MISSATGER PER L'ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA.....	170
9.1. OBTENCIÓ DE ARN.....	170
9.2. RETROTRANSCRIPTASE MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION (RT-MLPA).....	170
10. ANÀLISI ESTADÍSTIC.....	173

1. RECOLLIDA DE MOSTRES.

Les mostres de sang perifèrica dels pacients amb leucèmia limfocítica crònica (LLC) i les mostres de sang perifèrica de donants sans es van recollir al Servei d'Hematologia de l'Hospital Universitari de Bellvitge, en tubs anticoagulats amb EDTA. Tota la informació de la mostra es va recollir en una base de dades interna en la que es va anotar el diagnòstic, el número d'història clínica, la data de recollida de la mostra, el recompte leucocitari (milions de leucòcits per mL de sang), i el percentatge de limfòcits (% dels leucòcits). També es van anotar altres informacions d'interès, com les alteracions genètiques descrites del pacient, tractament en cas de tenir-ne, o resistència a agents quimioterapèutics. Aquesta base de dades ens permet assignar una numeració a cada pacient i mostra recollida, i està formada per dues parts: la primera, és un número propi de cada pacient, coincident per totes les mostres del mateix, i la segona, el número de mostra i any de recollida. Per exemple, 457_72/09 correspondria al pacient 457, mostra 72 recollida l'any 2009. A més, la base de dades ens permet obtenir gràfics de la limfocitosi històrica del pacient i l'existència de mostres anteriors criopreservades. En aquesta base de dades interna no s'inclou ninguna dada personal del pacient, tal i com estableixen els comitès ètics de la Universitat de Barcelona i de l'Hospital de Bellvitge. De les mostres de sang perifèrica de donants sans, no es recull ni es guarda cap informació referent al donant.

El diagnòstic de la LLC va ser realitzat per hematòlegs clínics de l'Hospital de Bellvitge, seguint criteris clínics, morfològics, immunofenotípics i moleculars de la classificació proposada per la Organització Mundial de la Salut (OMS, <http://www.who.int>). Els pacients donen el seu consentiment per escrit per l'ús de les mostres en estudis d'investigació, i els projectes estan avalats pels comitès ètics de la Universitat de Barcelona i de l'Hospital de Bellvitge.

2. PURIFICACIÓ DE LEUCÒCITS MONONUCLEATS DE SANG PERIFÈRICA.

A partir de mostres de sang perifèrica de LLC o de donants sans es va realitzar una purificació dels leucòcits mononucleats mitjançant un gradient de Ficoll-Hypaque (Figura 1). La sang perifèrica es va diluir en PBS fins a un volum final de 8 mL, que es va addicionar sobre 4 mL de la solució de Ficoll (densitat = 1.077 g/mL), amb molt de compte per mantenir la interfase. Per cada tub es poden purificar fins a 200 milions de leucòcits.

La preparació es va centrifugar a 850 g a temperatura ambient durant 20 minuts. La parada de la centrífuga es va fer sense fre, de manera suau per evitar trencar el gradient. En la separació resultant, els eritròcits i el leucòcits polimorfonucleats que tenen una major densitat es troben a la part inferior. Sobre la solució de Ficoll i formant un anell es troben les cèl·lules mononucleades i en la part superior es troba el plasma i les plaquetes diluïts en PBS. L'anell es va recollir amb una pipeta pasteur de vidre, es va rentar amb PBS i es va centrifugar 10 minuts a 480 g a temperatura ambient.

Els leucòcits mononucleats purificats contenen limfòcits B, limfòcits T i monòcits en proporcions variables segons el pacient. Si el percentatge de cèl·lules B és superior al 80 %, les mostres s'utilitzen per realitzar extraccions d'ARN i proteïna, o per fer mesures de viabilitat amb el marcatge d'Anexina V/iodur de propidi (IP). En els casos on el percentatge de cèl·lules B és inferior al 80%, les mostres no s'utilitzen per obtenir extractes i les determinacions de la viabilitat es realitzen amb marcatge de cèl·lules B i T, amb CD3/CD19/Anexina V.

Aquestes cèl·lules mononucleades obtingudes amb el Ficoll, es van utilitzar fresques (recent separades) o bé es van criopreservar per al seu ús posterior.

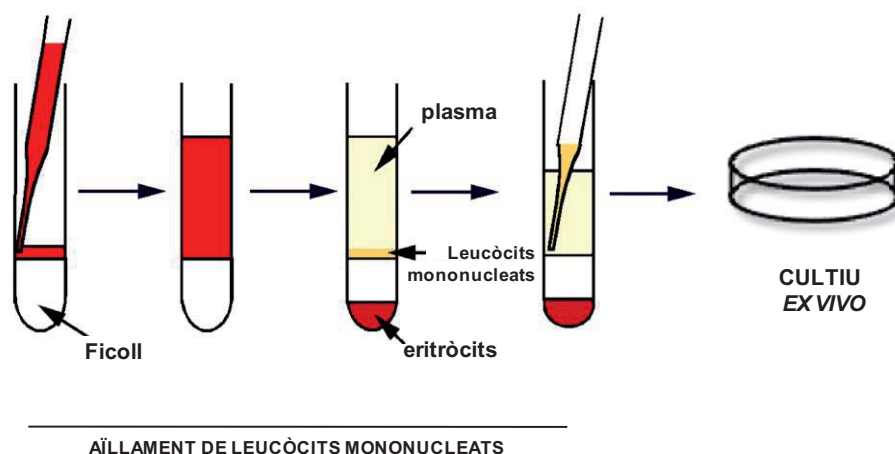


Figura 1. Esquema de purificació de leucòcits mononucleats de sang perifèrica.

2.1. PURIFICACIÓ DE CD19⁺.

Els leucòcits mononucleats purificats de donants sans tenen un percentatge baix de cèl·lules CD19⁺ i CD3⁺. A diferència de les cèl·lules de LLC, que tenen un percentatge alt de cèl·lules CD19⁺ i es poden utilitzar directament en cultiu després de realitzar el Ficoll, les cèl·lules de donants sans cal purificar-les si es volen obtenir cèl·lules amb una puresa prou alta com per obtenir extractes d'ARN o proteïna. Vam purificar les cèl·lules B CD19⁺ i les cèl·lules T CD3⁺ per selecció negativa utilitzant RosetteSep[®] Human B Cell Enrichment Cocktail o RosetteSep[®] Human T Cell Enrichment Cocktail (StemCell Technologies) respectivament. Vam afegir 50 µL/mL durant 20 minuts prèviament a la centrifugació de Ficoll. Amb aquest procediment eliminem totes les cèl·lules que no expressin CD19⁺ o CD3⁺, mitjançant anticossos que formen unes rosetes amb la resta de cèl·lules i els eritròcits, i que precipiten i queden al sediment al centrifugar amb el Ficoll.

Per comprovar l'eficàcia d'aquest procediment, es comproven els percentatges de cada població per citometria, abans i després de purificar, mitjançant un marcatge amb CD3/CD19/Anexina V (Figura 2).

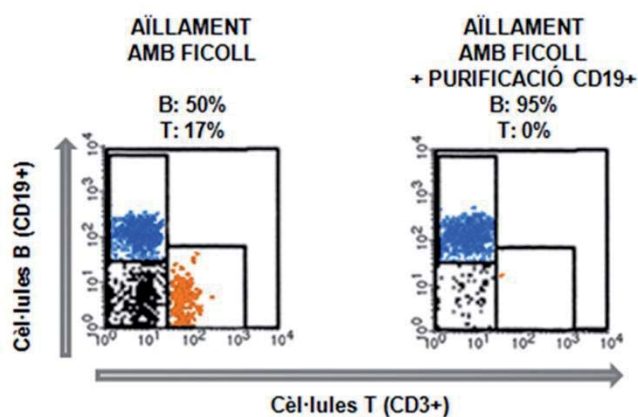


Figura 2. Purificació de cèl·lules de LLC CD19+. Mitjançant la purificació eliminem de la mostra les cèl·lules no tumorals, enriquint-la de cèl·lules de LLC.

3. CRIOPRESERVACIÓ I DESCONGELACIÓ.

La criopreservació de les cèl·lules de LLC permet el seu emmagatzematge per la seva posterior utilització. Els leucòcits mononucleats purificats es van resuspendre en sèrum boví fetal (FBS) fred, descomplementat prèviament amb calor (30 minuts a 56°C). Es va afegir al *pellet* o sediment de cèl·lules 0.75 mL de FBS per cada tub a congelar (20-30 x 10⁶ cèl·lules/mL de FBS). La suspensió resultant es va mantenir en fred, sobre gel, i es va barrejar lentament en un volum igual de solució de criopreservació (Taula 3), que conté DMSO també fred. La mostra es va al·liquotar en tubs de 2 mL, que es van mantenir en fred a -80°C durant 24 hores en un porexpan, per aconseguir una disminució progressiva de la temperatura. Després, es va traslladar la mostra al tanc de nitrogen líquid. En la base de dades s'afegeix la informació dels tubs congelats.

Per descongelar les cèl·lules, el tub criopreservat es va posar en un bany a 37°C. Quan el contingut del tub es va descongelar parcialment, es va vessar sobre un *falcon* de 50 mL de medi RPMI 1640 amb un 10% de FBS descomplementat, escalfat a 37°C prèviament, perquè la resta de cèl·lules es descongeli en un volum com a mínim 10 vegades superior. Les cèl·lules es van centrifugar durant 10 minuts a 480 g per eliminar el DMSO i es van resuspendre en medi de cultiu.

4. CULTIU CEL·LULAR.

Les cèl·lules de LLC o de donants sans, descongelades o acabades de purificar, es van cultivar en medi de cultiu RPMI 1640, en presència d'un 10% de FBS descomplementat, L-glutamina (2 mM) i antibiòtics (100 U/mL de penicilina i 100 µg/mL d'estreptomicina), en un incubador amb atmosfera humida al 5% de CO₂ i a temperatura constant de 37°C. Les cèl·lules es van cultivar en presència dels factors corresponents o en absència d'ells, segons correspongui en cada experiment, a una concentració de entre 1-3 x 10⁶ cèl·lules/mL durant el temps establert per a cada assaig.

Abans de realitzar un cultiu cel·lular primari es van determinar els percentatges de les diferents poblacions i la seva viabilitat a temps 0 hores (veure apartat Anàlisi de la viabilitat cel·lular).

5. SEGURETAT.

Les manipulacions de les mostres primàries humanes van ser realitzades en una cabina de flux laminar de bioseguretat IIA i cultivades en incubadors d'ús exclusiu per cèl·lules primàries d'origen humà (<http://www.ub.es/ossma/higiene/cultiuscel.htm>).

6. ANÀLISI DE LA VIABILITAT CEL·LULAR.

L'anàlisi de la viabilitat cel·lular es va realitzar per citometria de flux. El citòmetre utilitzat va ser el FACScalibur (Beckton Dickinson). Aquest model disposa de 2 làsers d'excitació, el primer a 488 nm i el segon a 635 nm. Els fotodetectors són 4: FL1 (530/30), FL2 (585/42) i FL3 (670LP), que detecten els espectres d'emissió quan s'excita amb el primer laser (488) i el FL4 (661/10), quan s'excita amb el segon laser (635). Així es poden utilitzar diferents fluorocroms per la mateixa mostra, sempre i quan els fluorocroms siguin excitables per aquests làsers i l'espectre d'emissió sigui detectat pels diferents fotodetectors. A més, el citòmetre pot detectar dues característiques cel·lulars: la mida (FSC) i la densitat cel·lular (o complexitat, SSC) (Figura 3).

FACSCalibur Optical Layout

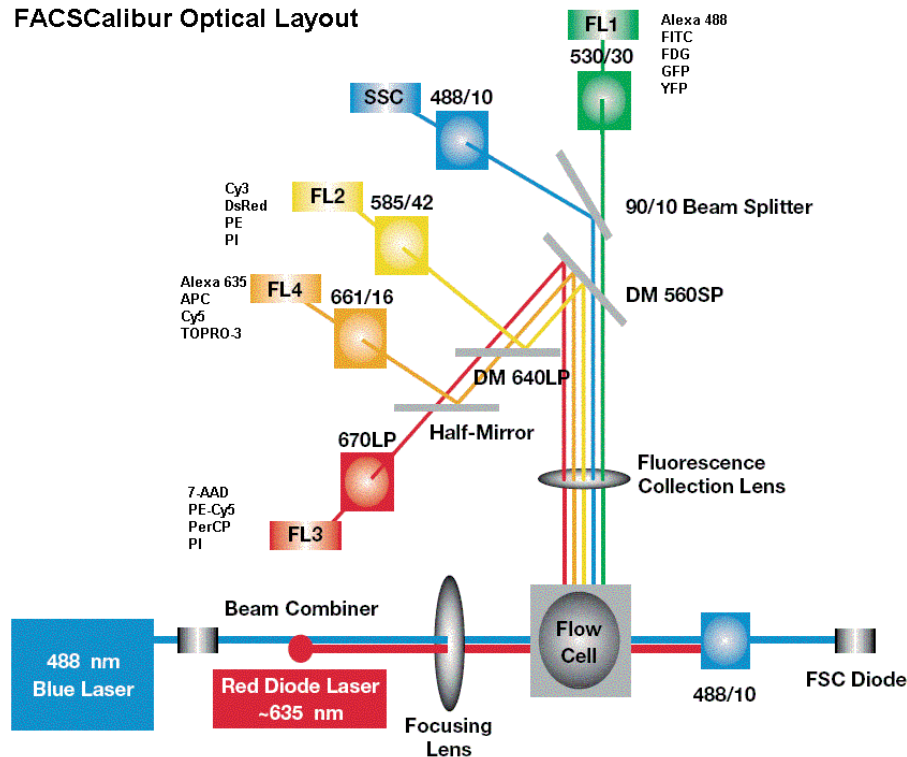


Figura 3. Esquema del funcionament del FACSCalibur. El citòmetre disposa de 2 làsers i 4 fotodetectors (FL). A més, detecta dues característiques cel·lulars, la mida (FSC) i la complexitat (SSC). A l'esquema es representen els fotodetectors que s'han d'utilitzar per la detecció dels fluorocroms més comuns (<http://www.bdbiosciences.com>).

La membrana cel·lular està formada per una bicapa lipídica asimètrica, amb diferent composició en la seva cara interna i externa. La fosfatidilserina, és un fosfolípid que generalment es localitza en la cara interna de les cèl·lules vives, i en condicions apoptòtiques transloca a l'externa (Figura 4). La translocació de fosfatidilserina a la cara externa es considera un efecte inicial en la inducció d'apoptosi en les cèl·lules de mamífer. L'anexina V és una proteïna que té una gran afinitat per la fosfatidilserina de manera dependent de calci (Ca^{2+}), sempre que aquesta es trobi accessible, tal i com succeeix quan s'externalitza durant l'apoptosi. L'anexina V es conjuga amb fluorocroms com el isotiocianat de fluoresceïna (FITC) de manera que les cèl·lules apoptòtiques que exposen fosfatidilserina i conjugades amb anexina V-FITC poden ser excitées a 488 nm, i detectades pel citòmetre (FL1).

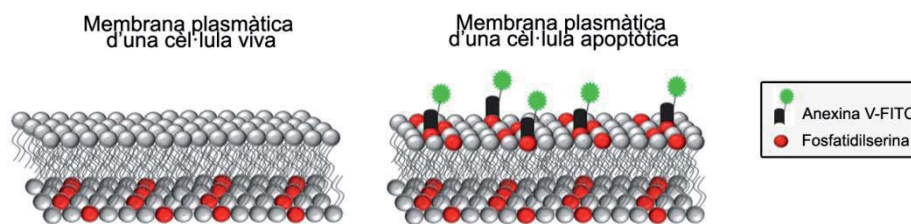


Figura 4. Marcatge de les cèl·lules apoptòtiques amb anexina V. Quan les cèl·lules entren en apoptosi es perd l'asimetria de la bicapa lipídica i els residus de fosfatidilserina queden exposats en la superfície extracel·lular. L'anexina V és una molècula que s'uneix específicament a aquests residus de fosfatidilserina. Unida a fluorocroms com el FITC, l'anexina permet analitzar la quantitat de cèl·lules que entren en apoptosi.

A més, durant l'apoptosi la membrana plasmàtica perd la seva integritat i la seva impermeabilitat a compostos com el iodur de propidi (IP). Aquests procés es produeix més tard que la translocació de la fosfatidilserina, i també es dona en la mort per necrosi. Quan l'IP pot entrar a la cèl·lula s'intercala entre les cadenes d'àcids nucleics. L'IP, a l'excitar-se a 488 nm, pot ser detectat tant per FL2 com per FL3.

La viabilitat es va determinar mitjançant el doble marcatge de les cèl·lules amb Anexina V-FITC i IP, per citometria de flux. Així, utilitzant aquests marcadors (Figura 5) es poden distingir tres poblacions de cèl·lules durant el procés d'apoptosi. Una primera població de cèl·lules no emet ninguna fluorescència (cèl·lules vives), una altra positiva per Anexina V i negativa per marcatge IP (cèl·lules en un estat inicial d'apoptosi) i una altra amb el doble marcatge anexina V-FITC i IP (cèl·lules en un estat més tardà del procés apoptòtic). L'aparició d'aquestes tres poblacions és un indicatiu d'una apoptosi típica. Existeix la possibilitat de l'aparició d'una quarta població que només marcaria IP, i seria senyal de la possible existència d'un procés necròtic.

6.1. PROTOCOL ANEXINA V/IP.

2.5×10^5 cèl·lules mononucleades es van incubar en presència dels factors corresponents al temps indicat per a cada experiment. Es van recollir les cèl·lules en un tub de citometria sobre una solució que té calci (TA, Taula 3). Les cèl·lules es van centrifugar 10 minuts a 480 g, seguidament es van resuspendre en 100 μ L de TA amb 1 μ L d'anexina V-FITC. Es van incubar durant 15 minuts a temperatura ambient i en un lloc fosc. Transcorregut el temps es van diluir amb 100 μ L de TA amb IP a una concentració final de 1 μ g/mL. En el citòmetre es van adquirir 10000 events (cèl·lules) que es van analitzar amb el programa CellQuest (de Beckton Dickinson) (Figura 5).

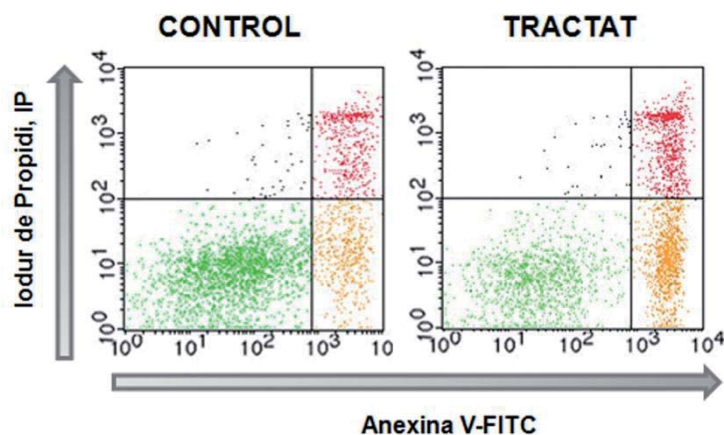


Figura 5. Exemple d'anàlisi de la citometria de flux Annexina V/IP de l'efecte citotòxic d'un tractament. Les cèl·lules tractades amb un agent apoptòtic (TRACTAT) o sense tractar (CONTROL), es van incubar amb anexina V-FITC i IP i es van analitzar per citometria de flux. Les cèl·lules apoptòtiques exposen fosfatidilserina en la membrana i marquen anexina (cèl·lules taronges). Quan el procés d'apoptosi avança, la membrana cel·lular es torna permeable per l'IP, i es tornen positives per a aquest fluorocrom (cèl·lules vermelles). Les cèl·lules vives són anexina i IP negatives (cèl·lules verdes). En aquest exemple, al control hi ha un 64% de cèl·lules Annexina/IP negatives (i per tant, vives), mentre que al tractat només n'hi ha un 37%.

Aquest protocol és adient quan la població que volem analitzar té prou puresa en la mostra, per sobre del 80%. Quan el percentatge és menor s'ha d'analitzar la viabilitat de cada una de les poblacions d'interès mitjançant marcadors específics. Per estudiar les diferents poblacions de limfòcits provinents de leucòcits mononucleats purificats de les mostres de sang perifèrica, s'utilitzen anticossos marcats amb fluorocroms que reconeixen específicament un antigen de membrana que només es troba en una de les poblacions. Anti-CD19 es va utilitzar per marcar limfòcits B i anti-CD3 per marcar limfòcits T. Els fluorocroms utilitzats són ficoeritrina (PE) per CD19 i alofococianina (APC) per CD3. A més, afegint anexina V-FITC es pot determinar per separat la viabilitat d'aquestes dues poblacions de limfòcits (Figura 6). Un problema de la tècnica és que durant certs processos d'apoptosi, els antigens de la membrana es poden perdre (Diaz *et al.*, 2004). Això depèn del tractament utilitzat per induir apoptosi i el temps de cultiu. Si això succeís, observariem que les poblacions que marquessim sempre estarien vives i al morir perdrien l'antigen i serien despreciades. Per evitar això, cal comparar el percentatge de cada una de les poblacions en la mostra tractada respecte a la mostra control, i si són coincidents, el resultat és fiable.

6.2. PROTOCOL CD3/CD19/ANEXINA V.

5×10^5 cèl·lules mononucleades es van incubar en presència dels factors corresponents i el temps indicats per a cada experiment. Es van recollir les cèl·lules en un tub de citometria sobre TA i es van centrifugar durant 10 minuts a 480 g. A continuació es van incubar les cèl·lules amb

50 µL de TA i amb 2 µL de anti-CD19-PE i 2 µL de anti-CD3-APC durant 10 minuts a temperatura ambient i en un lloc fosc. Transcorregut aquest temps d'incubació, les cèl·lules es van diluir en 100 µl de tampó TA i 1 µL d'anexina V-FITC durant 15 minuts. En el citòmetre es van adquirir 30000 cèl·lules. Amb aquest protocol podem analitzar l'apoptosi induïda en cada una de les poblacions de limfòcits (B i T) per separat. A més, indica el percentatge de cada població, de manera que es pot valorar la riquesa en limfòcits B (CD19⁺) abans de processar les mostres.

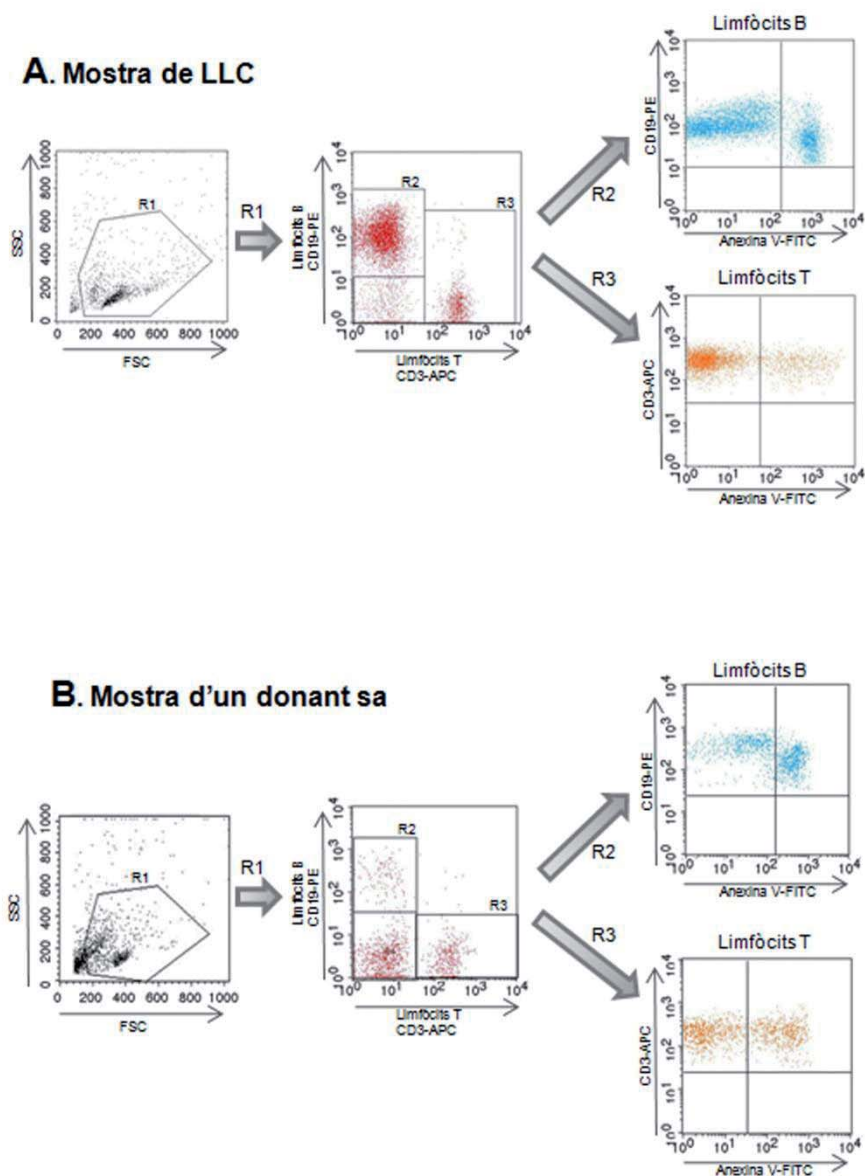


Figura 6. Imatges de citometria de flux d'anexina /CD19/CD3. La separació de les poblacions B (CD19, R2) i T (CD3, R3) permet analitzar la unió a anexina de cada una de les poblacions. (A) mostra de LLC, (B) mostra d'un donant sa.

6.3. PROTOCOL PER LA DETECCIÓ DEL PIC SUBDIPLOID.

2×10^6 cèl·lules mononucleades es van incubar en presència dels factors corresponents el temps indicats per cada experiment. Es van recollir les cèl·lules en un falcon de 15 mL i es van centrifugar durant 10 minuts a 400 g. A continuació es va resuspendre el *pellet* en 1 mL de PBS amb 1% de FBS, i es va centrifugar durant 5 minuts a 500 g. Aquest pas es va repetir una altra vegada, i després de la centrifugació, el *pellet* es va resuspendre en 0.5 mL de PBS amb 1% de FBS, i es va afegir gota a gota sobre un falcon de 15 mL amb 5 mL de Etanol 70%. Mentre s'afegia, fèiem un vòrtex suau. Ho vam congelar a -20°C , entre 1 i 7 dies. I el dia que tenim la citometria, vam treure els falcons del congelador, i ràpidament els vam centrifugar durant 10 minuts a 800 g. Vam rentar el *pellet* amb 1 mL de PBS amb 1% de FBS, centrifugant 10 minuts a 800 g, i vam resuspendre el *pellet* en 200 μL de PBS amb 1% de FBS, que vam dividir de la següent manera: (1) 100 μL , vam afegir 5 μL anti-CD19-APC 100 μL de PBS amb 1% de FBS; (2) 100 μL , vam afegir 5 μL anti-CD3-APC 100 μL de PBS amb 1% de FBS; i vam incubar a temperatura ambient i en un lloc fosc durant 30 minuts. Passat aquest temps, vam afegir 25 μL d'IP (0.5 mg/mL) i 1 μL de RNasa (20mg/mL), i vam incubar a temperatura ambient i en un lloc fosc durant 30 minuts, i vam passar pel citòmetre. Degut a l'alta fluorescència de l'IP, hem hagut d'utilitzar CD19 i CD3 marcats amb el mateix fluorocrom (APC), ja que la detecció d'altres fluorocroms (FITC i PE) es solapava amb l'IP. Per això, de cada condició es preparen 3 tubs: (1) cèl·lules sense marcar, (2) cèl·lules CD19-APC/IP, (3) cèl·lules CD3-APC/IP.

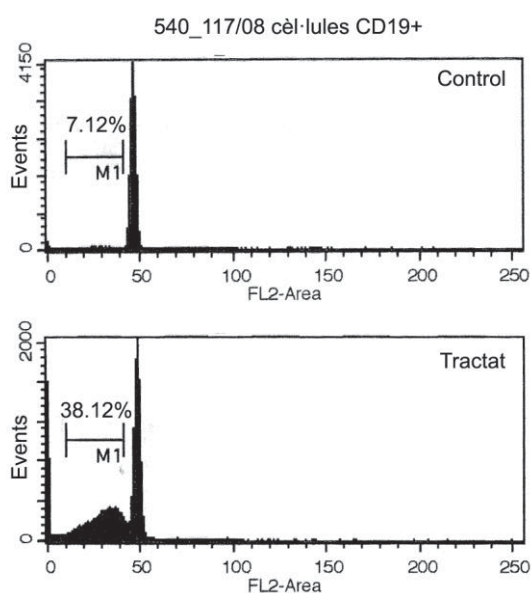


Figura 7. Imatges de citometria de flux de la detecció del pic subdiploid. Cèl·lules de LLC es van incubar sense o amb un tractament que va induir apoptosi. A les 24 hores, es van incubar amb CD19-APC i IP, i es va analitzar el pic subdiploid en cada condició.

7. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ DELS RECEPTORS DE MORT (FAS, DR4 I DR5).

L'anàlisi de l'expressió dels receptors de mort en la superfície cel·lular es va realitzar per citometria de flux, amb el mateix citòmetre que l'utilitzat per l'anàlisi de la viabilitat cel·lular (FACScalibur de Beckton Dickinson).

Per cada pacient, es van recollir 4 tubs de citometria, amb 3×10^5 cèl·lules mononucleades en cadascun sobre 1 mL de PBS estèril, i es van centrifugar durant 10 minuts a 1500 rpm. Es va aspirar en sobrenedant i es van resuspendre les cèl·lules amb 100 μ L de PBS amb 2 μ L de CD19-APC, i amb 1 μ L FAS-PE o 5 μ L DR4-PE o 5 μ L DR5-PE (un anticòs marcat amb PE diferent a cada tub, excepte el control que només tindrà CD19-APC). Es van incubar durant 30 minuts a les fosques. A continuació, es van afegir a cada tub 500 μ L de PBS per rentar, i es va centrifugar 10 min a 1500 rpm. Es van resuspendre les cèl·lules amb 150 μ L de PBS i es va passar per citometria. En el citòmetre es van adquirir 30000 events (cèl·lules) que es van analitzar amb el programa CellQuest (de Beckton Dickinson).

8. ANÀLISI DE PROTEÏNES.

8.1. EXTRACCIÓ DESNATURALITZANT D'EXTRACTES TOTALS.

Entre 2 i 5×10^6 de cèl·lules es van incubar en presència dels factors corresponents durant el temps indicat per cada experiment. Es van recollir i es van separar del medi per centrifugació durant 10 minuts a 480 g. El *pellet* o sediment es va resuspendre amb PBS i es va centrifugar de nou durant 10 minuts a 480 g per eliminar completament el medi de cultiu. Per lisar el *pellet* es van afegir 50-100 μ L de tampó de Laemli (SB, Taula 3) i es va vortejar durant 10 segons. Les mostres es van escalfar a 95°C durant 10 minuts. Si el procés de lisi del *pellet* va resultar parcial, les mostres es van congelar a -80 °C i es va repetir el cicle de vorteig i escalfament a 95°C durant 10 minuts més. El protocol permet l'obtenció d'extractes desnaturalitzats al tenir el SB SDS en la seva composició.

8.2. QUANTIFICACIÓ DE PROTEÏNES.

Per l'anàlisi de proteïnes mitjançant la tècnica de Western blot, prèviament s'ha de quantificar la concentració de proteïnes existents en la mostra per carregar la mateixa quantitat de cada mostra en cada pou del gel d'electroforesi. La quantificació de proteïnes es va dur a terme amb el kit "Micro BCA Protein Assay Reagent", utilitzant el lector de plaques a 550 nm. Aquest kit es basa en una detecció colorimètrica quantitativa amb l'àcid bicinrònic (BCA) que detecta la reducció de coure deguda al entorn bàsic de les proteïnes. És un reactiu compatible amb la presència de diversos detergents, entre ells un 1% SDS. Dues molècules de BCA quelen una molècula de Cu^+ i el complex resultant presenta color, de manera directament proporcional a la quantitat de proteïna existent en la mostra.

8.3 ANÀLISI DE LES PROTEÏNES MITJANÇANT WESTERN BLOT.

Els extractes de proteïnes es van preparar per l'electroforesi en condicions desnaturalitzants i reductores en presència de SB, DTT 100 mM i Blau de bromofenol, que s'utilitza com a indicador de l'avanç del front de proteïnes en l'electroforesi. Les mostres es van escalfar durant 10 minuts a 95 °C per desnaturalitzar-les completament abans de carregar-les al gel.

El gel (SDS-PAGE) està format per una part concentradora (Taula 3), que es prepara a una concentració de 3% d'acrilamida i d'una part separadora (Taula 3) que en funció de les proteïnes que es vulguin analitzar, es prepara del 8 al 15% d'acrilamida. A menor mida de proteïna a analitzar major és el percentatge del gel a preparar, per permetre una millor resolució de les proteïnes per la seva mida. Així doncs, els gels SDS-PAGE es van preparar amb el percentatge adequat d'acrilamida (proporció 37.5:1, acrilamida:bisacrilamida, Bio-Rad).

Les mostres es van carregar en els pous generats a la part del gel concentrador i l'electroforesi es va realitzar en cubetes amb tampó d'electroforesi (Taula 3) aplicant un corrent elèctric de 30-40 mA/gel (125 mV). Un cop finalitzada l'electroforesi es va dur a terme el procés de transferència en el que les proteïnes es van fixar en una membrana de PVDF activada prèviament amb metanol i aigua. Es va aplicar un corrent de 400 mA durant 1 hora (per un gel petit) o 2 hores (per un gel gran) en una cubeta amb tampó de transferència (Taula 3), en fred i en agitació contínua per evitar un escalfament excessiu. Quan la transferència va finalitzar, les membranes es van rentar en TBS-T (Taula 3) durant uns minuts i es van incubar durant 1 hora amb la solució de bloqueig (Taula 3) per bloquejar les unions inespecífiques d'anticòs primari. A continuació, les membranes es van incubar en presència del anticòs primari contra la proteïna d'interès en cada cas (Taula 2). Després de la incubació amb l'anticòs primari es van realitzar tres rentats de 5 minuts cada un amb TBS-T i es va incubar durant 1 hora en presència del anticòs secundari preparat en solució de bloqueig. L'anticòs secundari reconeix la regió constant del anticòs primari. Finalment, es van realitzar 3 rentats de 5 minuts cada un amb TBS-T i un últim rentat de 10 minuts amb TBS (Taula 3). Per la detecció del anticòs secundari es va utilitzar la solució d'ECL. Aquesta solució, en contactar amb l'enzim HRP (*horse radish peroxidase*) de l'anticòs secundari, s'oxida i emet luminiscència. La membrana es va col·locar en un *cassette* amb la solució d'ECL i una pel·lícula fotogràfica per detectar la llum emesa per la membrana en la zona on l'anticòs secundari, unit al primari, va detectar la proteïna d'interès. La pel·lícula es va revelar pels mètodes tradicionals de revelador i fixador.

Una membrana de PVDF es pot reutilitzar per detectar varies proteïnes, però si les proteïnes d'interès tenen un pes molecular pròxim, la detecció de la primera interferiria amb la segona. Si això succeeix s'ha de realitzar una deshibridació de membranes.

8.4. DESHIBRIDACIÓ DE MEMBRANES.

Per eliminar les restes d'anticòs units a les proteïnes de la membrana de PVDF, les membranes es van rentar en condicions desnaturalitzants, en una solució de deshibridació (Taula 3) a una temperatura de 56 °C durant 30 minuts en agitació. Després, les membranes es van rentar 5 vegades en solució de TBS-T durant 15 minuts cada vegada, abans de ser reutilitzada.

9. OBTENCIÓ I ANÀLISI D'ARN MISSATGER PER L'ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA.

L'estudi de l'expressió gènica de manera quantitativa es va realitzar mitjançant la tècnica de *Retrotranscriptase multiplex ligation-dependent probe amplification* (RT-MLPA). En primer lloc, cal extreure l'ARN de les cèl·lules, tal i com es descriu en el següent apartat.

9.1 OBTENCIÓ D'ARN.

Per obtenir ARN total es va utilitzar el kit *RNeasy micro Kit* (Qiagen). Es van recollir $3-5 \times 10^6$ cèl·lules de LLC per condició. Es van centrifugar durant 10 minuts a $480 \times g$ i es va prosseguir segons el protocol de la casa comercial, sempre a temperatura ambient (a diferència d'altres mètodes de purificació de ARN). Les mostres d'ARN total es van quantificar per espectrofotometria, mitjançant el Nanodrop.

Per obtenir i treballar amb solucions d'ARN, tot el material utilitzat ha d'estar autoclavat, lliure de RNAases i s'ha de treballar amb guants per tal d'evitar que les RNAases degradin l'ARN.

9.2 RETROTRANSCRIPTASE MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION (RT-MLPA).

El RT-MLPA és un mètode que permet analitzar el número de còpies de més d'un ARN missatger (ARNm) en un sol tub de reacció (Eldering, *et al.*, 2003). Es pot aplicar tant per analitzar el número de còpies d'ADN genòmic d'una seqüència com per analitzar el perfil d'expressió d'ARNm de les condicions d'interès. En el nostre cas, hem utilitzat els *kits* R011_Apoptosis i R011-B1_Apotosis (MRC-Holland), que ens permeten analitzar el perfil d'expressió de 37 gens, 32 dels quals estan relacionats amb l'apoptosi (Taula 1). El mètode es basa en que cada gen a analitzar té dissenyat un parell de sondes complementàries a la cadena de ADNc, una consecutiva a l'altra. A més, cada una de les sondes té una cua de nucleòtids de mida variable per cada un dels gens. Així doncs, les sondes s'hibriden a l'ADNc i quantes més còpies d'un ADNc existeixin, més sondes tindrà hibridades. A continuació es realitza una reacció de lligació de les 2 sondes hibridades, que té lloc si les sondes s'han hibridat a l'ADNc, i no en cas d'hibridació a l'ADN genòmic. El disseny de les sondes es realitza contra zones entre exons i introns i està fet i optimitzat per la casa comercial. En els extrems de

totes les sondes s'ha afegit un parell de seqüències idèntiques, que permet realitzar una PCR amb només un parell de *primers* (cebadors) per tots els productes de lligació. Els cebadors estan marcats amb FAM. Així doncs, el producte final de PCR són varies seqüències de nucleòtids de mida diferent segons el gen a analitzar. Mitjançant una electroforesi capil·lar es separen els productes per mida i es determina l'àrea de fluorescència que emet cada producte, la mida de la qual serà directament proporcional a la quantitat inicial de ARNm del gen d'interès. Entre els gens analitzats hi ha cinc potencialment normalitzadors, i en les cèl·lules de LLC, generalment s'utilitza per normalitzar el gen β -glucuronidasa (*GUSB*) (Taula 1). Les dades obtingudes es normalitzen amb el normalitzador adequat en cada tipus cel·lular per compensar errors en la càrrega inicial d'ARN. La comparació de dues mostres normalitzades per un dels gens que existeix en el kit ens permet analitzar si d'un gen s'ha inhibït o activat la seva transcripció després d'un tractament.

Al començar aquesta tesi, MRC Holland comercialitzava el kit anomenat SALSA MLPA KIT R011 Apoptosis mRNA. Actualment comercialitza el kit SALSA MLPA KIT R011-B1 Apoptosis mRNA, amb algunes diferències respecte el primer kit: s'han afegit noves sondes per detectar els gens *TNFRSF21*, *CDKN1A*, *NTRA2/OMI*, *FLIP* (una nova sonda) i *GRANZIME*, i s'han eliminat les sondes de *MCL1_S*, *BAX2*, *APAF_L* i *APAF_{XL}* (Taula 1).

En el RT-MLPA les dades obtingudes es poden representar de diferents maneres per destacar diferents aspectes dels resultats. Representant directament els valors dels pics de l'electroforesi, s'obté l'"expressió relativa", que ens dóna una idea de la quantitat d'ARNm de cada gen. També podem representar la variació en els nivells de cada missatger respecte el seu control, obtenint les "vegades d'inducció". En aquesta representació es destaquen les induccions d'expressió de cada gen.

El protocol a seguir per realitzar el RT-MLPA és:

200 ng d'ARN total van ser retrotranscrits utilitzant sondes específics per a cada gen d'interès. L'ADNc va ser incubat durant 16 hores amb les sondes del *kit* a 60°C. Els oligonucleòtids van ser lligats afegint la Ligase-65 (Promega) durant 15 minuts a 54°C. Els productes de la lligació van ser amplificats per PCR (37 cicles, 30 segons a 95°C; 30 segons a 60°C, y 1 minut a 72°C). Els fragments amplificats, producte de PCR, van ser separats per electroforesi capil·lar en un *48-capillary ABI-Prism 3730 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems/Hitachi, Foster City, CA). L'àrea de cada un dels pics va ser analitzat utilitzant el programa *Genemapper (analysis software, Applied Biosystems)*.

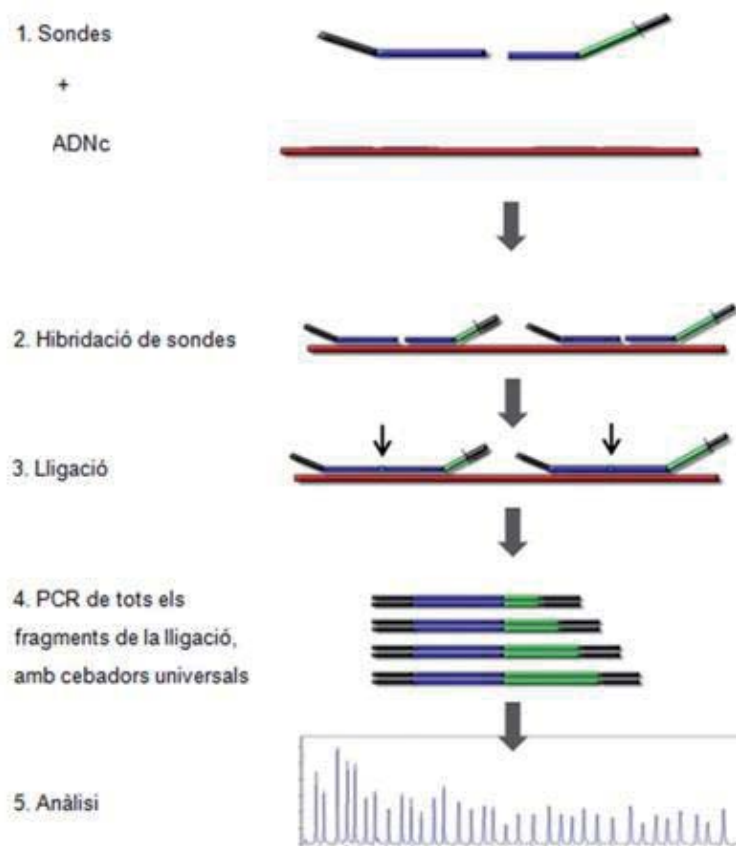


Figura 8. Esquema representatiu de la realització de RT-MLPA. Sondes específiques per cada un dels gens s'hibriden als ADNc retrotranscrits a partir de l'ARN total. 16 hores després es realitza la lligació de les sondes. Cada un dels productes de lligació té una mida característica i es realitza una electroforesi capil·lar per separar cada una de les mides. Cada un dels pics de l'anàlisi correspon a un ARNm i li correspon una àrea directament proporcional a la quantitat d'ARNm.

GEN	TAMANY DEL PRODUCTE DE PCR (pb)	GEN	TAMANY DEL PRODUCTE DE PCR (pb)
TNFRSF21	116	NAIP	292
CDKN1A (p21)	130	HIAP2	301
NTRA2/OMI	136	HIAP1	310
BCLW	142	XIAP	319
FLIP	148	SURVIVIN	328
BCLX	154	BRUCE	337
NOXA	160	LIVINA	346
BCL2	166	SERPINA	355
BFL1	172	PUMA	364
MCL1 S	178	PARN	373
FLIP	178	AIF	382
MCL1 L	184	MOAP1	391
B2M	193	GUSB	400
BAD	202	BNIP3L	409
BAX1	211	APAF	418
BAX2	220	APAF L	427
BAK	229	GZMB	427
BIM	238	APAF XL	433
BID	247	BNIP3	445
BCL-R	256	SMAC	454
BCLG	265	BMF	463
HRK	274	BIK	472
FTL	283		

Taula 1. Llistat de gens relacionats amb l'apoptosi analitzats simultàniament per RT-MLPA. Mida de cada un dels productes de PCR segons les dades de la casa comercial. En vermell i verd s'indiquen les sondes que s'han eliminat (vermell) o afegit (verd) al nou kit R011-B1. En blau, s'indiquen els gens potencialment normalitzadors. Les sondes de *BCLG*, *HIAP2* y *LIVINA* no són funcionals segons dades del grup i de la casa comercial.

10. ANÀLISI ESTADÍSTIC

Quan s'indica, els resultats es mostren com la mitja \pm error estàndar (SEM) dels valors obtinguts en experiments independents. Per analitzar la selectivitat de les drogues cap a cèl·lules B o T es va realitzar un test *t* de Student de dades aparellades. Les diferències es van considerar significatives per valors de P inferiors a 0.05. Les dades es van analitzar mitjançant el programa SPSS 14.

Taula 2. Anticossos primaris utilitzats per a Western blot.

ANTICOS	PES MOLECULAR (KDa)	EPÍTOP	DILUCIÓ	ORIGEN*	CLON O REFERÈNCIA	CASA COMERCIAL
β-ACTINA	45	Extrem N-terminal	1/5000	R	AC-15; A5441	Sigma
P-Ser473 Akt	60	P-Ser473	1/1000	C	#9271	Cell Signaling
P-Thr308 Akt	60	P-Thr308	1/1000	C	OPA1-03060	Affinity Bioreagents
P-(Ser/Thr) Akt substrate antibody		(R/K)X(R/K)XX(T*/S*)	1/1000	C	#9611	Cell Signaling
Akt1	60	Extrem C-terminal	1/1000	Ca	C-20; sc-1618	Santa Cruz Biotechnology
BCL-2	26	Aa. 41-54	1/1000	R	Clone124; Cod.No.M0887	Dako
P-ERK	42, 44	Thr202, Tyr204	1/1000	R	#9106	Cell Signaling
ERK2	42	-	1/1000	R	#05-157; clone1B3B9	Upstate
P-FoxO1(Thr24) P-FoxO3a(Thr32)	78 a 82 95	P-Thr24, P-Thr32	1/1000	C	#9464	Cell Signaling
P-FoxO3a	95 kDa	P-Ser318/321	1/1000	C	#9465	Cell Signaling
P-GSK3α/β	51, 46	P-Ser21, P-Ser9	1/1000	C	#9331	Cell Signaling
MCL-1	40 (MCL-1 _L) 32 (MCL-1 _S)	Domini intern	1/1000	C	S-19; sc-819	Santa Cruz Biotechnology
NOXA	11	Proteïna de fusió	1/250	R	114C307; ab13654	Abcam
p53	53	Aa. 37-45	1/200	R	Ab-5; Clone DO-7	Neomarkers
P-substats PKC		(R/K)X(S*)Hyd(R/K)	1/1000	C	#2261	Cell Signaling
PUMA	23	Aa. 2-16	1/500	C	Ab9645	Abcam

* C = conill; R = ratolí; Ca = cabra

ANTICOSSOS SECUNDARIS	DILUCIÓ	CASA COMERCIAL
anti-rabbit IgG, HRP linked whole antibody (from donkey)	1/5000	GE Healthcare
anti-mouse IgG, HRP linked whole antibody (from sheep)	1/5000	GE Healthcare
Polyclonal Rabbit anti goat immunoglobulins/HRP	1/1000	Dako

Taula 3. Principals tampons i solucions utilitzats.

TAMPÓ	COMPOSICIÓ	CONCENTRACIÓ FINAL
PBS (Tampó fosfat salí) pH = 7,4	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄	140 mM 0,27 mM 0,81 mM 0,18 mM
TA (Tampó d'unió d'anexina) pH = 7,4	HEPES-NaOH NaCl CaCl ₂	10 mM 140 mM 2,5 mM
SB (Tampó de lisi total; Laemmli)	Tris-HCl pH 6,8 SDS Glicerol DTT	80 mM 2% 10% 0,1 M
Tampó d'electroforesi (1X) pH=8,3	Tris Glicina SDS	25 mM 192 mM 0,1%
Tampó de transferència (1X) pH=8,3	Tris Glicina Metanol	25 mM 192 mM 10% per proteïnes PM >30kDa 20% per proteïnes PM <30 kDa
Tampó apilador per electroforesi (upper) pH = 6,8	Tris SDS	0,5 M 0,4%
Tampó separador per electroforesi (lower) pH = 8,8	Tris SDS	1,5 M 0,4%
TBS (Tris Buffered Saline) 1X pH=7,4	Tris-HCl NaCl	20 mM 137 mM
TBS-T (TBS with Tween) 1X pH=7,4	TBS 1x Tween-20	1X 0,1%
Solució de bloqueig	TBS-T Llet descremada en pols	1X 5%
Solució de deshibridació (stripping) pH= 6,8	Tris SDS β-mercaptoetanol El β-mercaptoetanol s'afegeix just en el moment de la utilització.	62,5 mM 2% 100 mM

Taula 4. Productes

PRODUCTE	STOCK	PROVEÏDOR
Akti-1/2	10 mM en DMSO	Calbiochem
A-443654	10 mM en DMSO	Abbott
Anexina V-FITC	-	Bender Medsystems
AS702630	10 mM en DMSO	Merck Serono
AS606565	10 mM en DMSO	Merck Serono
AS606509	10 mM en DMSO	Merck Serono
AS252424	10 mM en DMSO	Merck Serono
AS605240	10 mM en DMSO	Merck Serono
Bis I	5 mM en DMSO	Calbiochem
Anti-CD19-APC	-	Becton Dickinson
Anti-CD19-PE	-	Becton Dickinson
Anti-CD3-APC	-	Becton Dickinson
Anti-CD3-PE	-	Becton Dickinson
Anti-DR4-PE	-	Becton Dickinson
Anti-DR5-PE	-	Becton Dickinson
DMSO	-	Sigma
Etanol	-	Merck
Edelfosina	10 mM en DMSO	cedit grup Dr. Mollinedo
Anti-FAS-PE	-	cedit grup Dra. Colomer
Genisteina	DMSO	Calbiochem
IL-4 recombinant humana	10 mg/mL en H ₂ O	Immunotools
Iodur de propidi (IP)	variable	Sigma / Bender Medsystems
F(ab') ₂ anti-humà IgM	0,5 mg/mL en H ₂ O	SoutherbBiotech
LY294002	25 mM en DMSO	Calbiochem
LY333531	10 mM en DMSO	Alexis Biochemicals
Nutlina-3a	10 mM en DMSO	Roche
PD98059	10 nM en DMSO	Calbiochem
Perifosina	10 mM en DMSO	cedit grup Dr. Mollinedo
PMA	0.16 mM en DMSO	Sigma
SB203580	10 mM en DMSO	Calbiochem
SDF-1 α	10 mg/mL en H ₂ O	Immunotools
SH-5	10 mM en DMSO	Alexis Biochemicals
estaurosporina	1 mM en DMSO	Sigma-Aldrich
Triciribine	10 mM en DMSO	Biaffin GmbH & Co KG
Wortmanina	10 mM en DMSO	Calbiochem
Z-VAD.fmk	200 mM en DMSO	Bachem

ABREVIACIONES

ABREVIACIONS

ADN: àcid desoxiribonucleic

AIF: *Apoptosis-Inducing Factor*

Akt/PKB: Proteïna Quinasa B

ALPs: alquifosfolípid

APAF-1: *apoptotic protease activating factor-1*

APC: aloficocianina

ARN: àcid riboxinucleic

ARNm: àcid riboxinucleic missatger

ATM: Ataxia telangiectasia mutada; *Ataxia telangiectasia mutated*

ATP: Adenosina trifosfat

BCL-2: *B cell leukemia/lymphoma-2*

BCR: Receptor de cèl·lules B

BH: *Bcl-2 homology*

BIM: *BCL-2-interacting mediator of cell death*

Bis I: Bisindolylmaleimida I (inhibidor de la PKC)

Caspases: Cisteïna-aspartat-proteases, *cysteine aspartyl-specific proteases*

CDK: *cyclin dependent kinase*

CED: *cell death abnormality*

DAG: diacilglicerol

DAPK1: *Death-associated protein kinase*

DD: dominis de morts, *death domain*

DED: dominis efectors de morts, *death effector domain*

DIABLO: *Direct IAP binding protein with low pI*

DISC: *death-inducing signaling complex*

DKO: doble knock-out

DMSO: Dimetilsulfòxid

DNA-PK: *DNA-dependent protein kinase*

FBS: Sèrum boví fetal; *Foetal bovine serum*

FDA: Food and Drug Administration

FISH: *Fluorescence in situ hybridization*

FITC: isotiocianat de fluoresceïna

FLIP: *FLICE inhibitory protein*

FoxO: *forkhead box transcription factor*

FS: fosfatidilserina

FSC: mida cel·lular; *forward scatter*

GMCF: *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*

GPCR: receptors acoblats a proteïna G

GSK3: glicogen sintasa quinasa 3

GUSB: β -glucoronidasa

HRP: *horse raddish peroxidase*

Hsp70: *Heat shock protein 70*

HtrA2 / Omi: Proteïna HtrA induïble per "heat-shock" de *Escherichia coli*

IAP: Proteïnes inhibidores de l'apoptosi; *Inhibitor of apoptosis proteins*

IgVH: immunoglobulin variable heavy chain

IKK: *Inhibitor of κ B (I- κ B) Kinase complex*

IL: Interleuquina

ABREVIACIONS

IP: Iodur de propidi
kDa: Kilodalton
KO: *Knock-out*
LBM: limfocitosi B monoclonal
LDH: lactat deshidrogenasa
LDT: temps de doblatge de limfòcits; *lymphocyte doubling time*.
LLC: Leucèmia limfocítica crònica
LOH: pèrdua d'heterozigositat, *loss of heterozygosity*
LTC: limfòcits T citotòxics
MDM2: *murine double minute*
MDR: malaltia mínima residual; *minimal residual disease*
M-LLC: clon mutat de LLC (*mutated*)
MOMP: permeabilització de la membrana mitocondrial externa; *mitochondrial outer membrane permeabilization*
mTORC: *mamalian target of rapamycin complex*
NF- κ B: *Nuclear factor κ B*
PBLs: Limfòcits de sang perifèrica
PBS: tampó fosfat salí
PCR: Reacció en cadena de la polimerasa; *Polymerase Chain Reaction*
PDK1: *PI3K-Dependent Kinase 1*
PE: ficoeritrina
PH: domini d'homologia a plecstrina
PHLPP: *Pleckstrin homology (PH) domain leucine-rich repeat protein phosphatase*
PI, PdtIns: fosfatidilinositols
PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinasa; *Phosphatidylinositol-3 kinase*
PIP₃: Fosfatidilinositol-3, 4, 5-fosfat
PKC: Proteïna quinasa C
PLC: Fosfolipasa C
PMA: *phorbol 12-myristate 13-acetate*
PTEN: *phosphatase with tensin homology, deleted on chromosme 10*
ROS: espècies reactives d'oxigen; *Reactive Oxygen Species*
RTK: receptors de tirosina quinasa
RT-MLPA: *Retrotranscriptase multiplex ligation probe amplification*
S6K: *p70 ribosomal S6 kinase* Smac: *Second Mitochondria-derived Activator of Caspase*
SDF-1 α : *Stromal cell-derived factor-1*
SDS: Dodecil sulfat sòdic
SDS-PAGE: *SDS-polyacrylamide gel electroforesis*
SEM: error estàndard de la mitja, *standard error of the mean*
SGK: *serum and glucocorticoid induced kinase*
SH: domini d'homologia a SRC
SSC: densitat cel·lular (o complexitat) *side scatter*
TA: Tampó d'unió (*binding*) anexina
TCL1: *T-cell leukemia 1*
TNF: Factor de necrosi tumoral; *tumor necrosis factor*
TRAIL: *TNF-related apoptosis-inducing ligand*
UM-LLC: Clon no mutat de LLC (*unmutated*)
WT: *Wild Type*
ZAP-70: *Zeta-associated protein 70*
Z-VAD.fmk: Benziloxycarbonil-Val-Ala-Asp-fluorometilcetona (inhibidor de caspasas)

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA**A**

Abrams ST, Lakum T, Lin K, Jones GM, Treweeke AT, Farahani M, et al. B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia cells is regulated by overexpressed active protein kinase C β . *Blood* 2007 Feb 1;109(3):1193-1201.

Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol.Cell* 2002 Feb;9(2):423-432.

Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 2007 Feb 26;26(9):1324-1337.

Aeder SE, Martin PM, Soh JW, Hussaini IM. PKC- η mediates glioblastoma cell proliferation through the Akt and mTOR signaling pathways. *Oncogene* 2004 Dec 2;23(56):9062-9069.

Algul C, Moulding DA, Edwards SW. Alternative splicing of Bcl-2-related genes: functional consequences and potential therapeutic applications. *Cell Mol.Life Sci.* 2004 Sep;61(17):2189-2199.

Al-Alwan MM, Okkenhaug K, Vanhaesebroeck B, Hayflick JS, Marshall AJ. Requirement for phosphoinositide 3-kinase p110 δ signaling in B cell antigen receptor-mediated antigen presentation. *J.Immunol.* 2007 Feb 15;178(4):2328-2335.

Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, et al. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.* 1996 Dec 2;15(23):6541-6551.

Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, et al. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α . *Curr.Biol.* 1997 Apr 1;7(4):261-269.

Alkan S, Huang Q, Ergin M, Denning MF, Nand S, Maududi T, et al. Survival role of protein kinase C (PKC) in chronic lymphocytic leukemia and determination of isoform expression pattern and genes altered by PKC inhibition. *Am.J.Hematol.* 2005 Jun;79(2):97-106.

Alvaro V, Levy L, Dubray C, Roche A, Peillon F, Querat B, et al. Invasive human pituitary tumors express a point-mutated alpha-protein kinase-C. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 1993 Nov;77(5):1125-1129.

Antignani A, Youle RJ. How do Bax and Bak lead to permeabilization of the outer mitochondrial membrane? *Curr.Opin.Cell Biol.* 2006 Dec;18(6):685-689.

Austen B, Powell JE, Alvi A, Edwards I, Hooper L, Starczynski J, et al. Mutations in the ATM gene lead to impaired overall and treatment-free survival that is independent of IGVH mutation status in patients with B-CLL. *Blood* 2005 Nov 1;106(9):3175-3182.

B

Backer JM. The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *Biochem.J.* 2008 Feb 15;410(1):1-17.

Bae YS, Kim Y, Park JC, Suh PG, Ryu SH. The synthetic chemoattractant peptide, Trp-Lys-Tyr-Met-Val-D-Met, enhances monocyte survival via PKC-dependent Akt activation. *J.Leukoc.Biol.* 2002 Feb;71(2):329-338.

Bain J, Plater L, Elliott M, Shpiro N, Hastie CJ, McLauchlan H, et al. The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem.J.* 2007 Dec 15;408(3):297-315.

BIBLIOGRAFIA

Bakhshi A, Jensen JP, Goldman P, Wright JJ, McBride OW, Epstein AL, et al. Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* 1985 Jul;41(3):899-906.

Bannerji R, Kitada S, Flinn IW, Pearson M, Young D, Reed JC, et al. Apoptotic-regulatory and complement-protecting protein expression in chronic lymphocytic leukemia: relationship to in vivo rituximab resistance. *J.Clin.Oncol.* 2003 Apr 15;21(8):1466-1471.

Barber DF, Bartolome A, Hernandez C, Flores JM, Redondo C, Fernandez-Arias C, et al. PI3Kgamma inhibition blocks glomerulonephritis and extends lifespan in a mouse model of systemic lupus. *Nat.Med.* 2005 Sep;11(9):933-935.

Barnett SF, Defeo-Jones D, Fu S, Hancock PJ, Haskell KM, Jones RE, et al. Identification and characterization of pleckstrin-homology-domain-dependent and isoenzyme-specific Akt inhibitors. *Biochem.J.* 2005 Jan 15;385(Pt 2):399-408.

Barragan M, Bellosillo B, Campas C, Colomer D, Pons G, Gil J. Involvement of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in the survival of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2002 Apr 15;99(8):2969-2976.

Barragan M, Campàs C, Bellosillo B, Gil J. Protein kinases in the regulation of apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma* 2003 Nov;44(11):1865-70.

Barragan M, de Frias M, Iglesias-Serret D, Campas C, Castano E, Santidrian AF, et al. Regulation of Akt/PKB by phosphatidylinositol 3-kinase-dependent and -independent pathways in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells: role of protein kinase C β . *J.Leukoc.Biol.* 2006 Dec;80(6):1473-1479.

Baudot AD, Jeandel PY, Mouska X, Maurer U, Tartare-Deckert S, Raynaud SD, et al. The tyrosine kinase Syk regulates the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells through PKCdelta and proteasome-dependent regulation of Mcl-1 expression. *Oncogene* 2009 Jul 6.

Bauer B, Jenny M, Fresser F, Uberall F, Baier G. AKT1/PKBalpha is recruited to lipid rafts and activated downstream of PKC isotypes in CD3-induced T cell signaling. *FEBS Lett.* 2003 Apr 24;541(1-3):155-162.

Bayascas JR. Dissecting the role of the 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) signalling pathways. *Cell.Cycle* 2008 Oct;7(19):2978-2982.

Bea S, Lopez-Guillermo A, Ribas M, Puig X, Pinyol M, Carrio A, et al. Genetic imbalances in progressed B-cell chronic lymphocytic leukemia and transformed large-cell lymphoma (Richter's syndrome). *Am.J.Pathol.* 2002 Sep;161(3):957-968.

Bellacosa A, Chan TO, Ahmed NN, Datta K, Malstrom S, Stokoe D, et al. Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain. *Oncogene* 1998 Jul 23;17(3):313-325.

Bellosillo B, Villamor N, Colomer D, Pons G, Montserrat E, Gil J. In vitro evaluation of fludarabine in combination with cyclophosphamide and/or mitoxantrone in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999 Oct 15;94(8):2836-2843.

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 Sep 1;100(5):1810-1816.

Beneteau M, Pizon M, Chaigne-Delalande B, Daburon S, Moreau P, De Giorgi F, et al. Localization of Fas/CD95 into the lipid rafts on down-modulation of the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway. *Mol.Cancer.Res.* 2008 Apr;6(4):604-613.

- Bernal A, Pastore RD, Asgary Z, Keller SA, Cesarman E, Liou HC, et al. Survival of leukemic B cells promoted by engagement of the antigen receptor. *Blood* 2001 Nov 15;98(10):3050-3057.
- Bi L, Okabe I, Bernard DJ, Wynshaw-Boris A, Nussbaum RL. Proliferative defect and embryonic lethality in mice homozygous for a deletion in the p110alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase. *J.Biol.Chem.* 1999 Apr 16;274(16):10963-10968.
- Bichi R, Shinton SA, Martin ES, Koval A, Calin GA, Cesari R, et al. Human chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted TCL1 expression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2002 May 14;99(10):6955-6960.
- Bilancio A, Okkenhaug K, Camps M, Emery JL, Ruckle T, Rommel C, et al. Key role of the p110delta isoform of PI3K in B-cell antigen and IL-4 receptor signaling: comparative analysis of genetic and pharmacologic interference with p110delta function in B cells. *Blood* 2006 Jan 15;107(2):642-650.
- Billottet C, Banerjee L, Vanhaesebroeck B, Khwaja A. Inhibition of class I phosphoinositide 3-kinase activity impairs proliferation and triggers apoptosis in acute promyelocytic leukemia without affecting atra-induced differentiation. *Cancer Res.* 2009 Feb 1;69(3):1027-1036.
- Billottet C, Grandage VL, Gale RE, Quattropiani A, Rommel C, Vanhaesebroeck B, et al. A selective inhibitor of the p110delta isoform of PI 3-kinase inhibits AML cell proliferation and survival and increases the cytotoxic effects of VP16. *Oncogene* 2006 Oct 26;25(50):6648-6659.
- Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguet H, Goasguen J, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981 Jul 1;48(1):198-206.
- Blagosklonny MV. Carcinogenesis, cancer therapy and chemoprevention. *Cell Death Differ.* 2005 Jun;12(6):592-602.
- Blalock WL, Navolanic PM, Steelman LS, Shelton JG, Moye PW, Lee JT, et al. Requirement for the PI3K/Akt pathway in MEK1-mediated growth and prevention of apoptosis: identification of an Achilles heel in leukemia. *Leukemia* 2003 Jun;17(6):1058-1067.
- Boggs KP, Rock CO, Jackowski S. Lysophosphatidylcholine and 1-O-octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine inhibit the CDP-choline pathway of phosphatidylcholine synthesis at the CTP:phosphocholine cytidyltransferase step. *J.Biol.Chem.* 1995 Mar 31;270(13):7757-7764.
- Bozulic L, Hemmings BA. PIKKing on PKB: regulation of PKB activity by phosphorylation. *Curr.Opin.Cell Biol.* 2009 Apr;21(2):256-261.
- Brachmann SM, Ueki K, Engelman JA, Kahn RC, Cantley LC. Phosphoinositide 3-kinase catalytic subunit deletion and regulatory subunit deletion have opposite effects on insulin sensitivity in mice. *Mol.Cell.Biol.* 2005 Mar;25(5):1596-1607.
- Brognaard J, Newton AC. PHLiPPing the switch on Akt and protein kinase C signaling. *Trends Endocrinol.Metab.* 2008 Aug;19(6):223-230.
- Brognaard J, Sierrecki E, Gao T, Newton AC. PHLPP and a second isoform, PHLPP2, differentially attenuate the amplitude of Akt signaling by regulating distinct Akt isoforms. *Mol.Cell* 2007 Mar 23;25(6):917-931.
- 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 Mar 19;96(6):857-868.
- Bullrich F, Rasio D, Kitada S, Starostik P, Kipps T, Keating M, et al. ATM mutations in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res.* 1999 Jan 1;59(1):24-27.

BIBLIOGRAFIA

Burger JA, Tsukada N, Burger M, Zvaifler NJ, Dell'Aquila M, Kipps TJ. Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood* 2000 Oct 15;96(8):2655-2663.

Byrd JC, Lin TS, Grever MR. Treatment of relapsed chronic lymphocytic leukemia: old and new therapies. *Semin.Oncol.* 2006 Apr;33(2):210-219.

Byrd JC, Stilgenbauer S, Flinn IW. Chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am.Soc.Hematol.Educ.Program.* 2004:163-183.

C

Cai H, Smola U, Wixler V, Eisenmann-Tappe I, Diaz-Meco MT, Moscat J, et al. Role of diacylglycerol-regulated protein kinase C isotypes in growth factor activation of the Raf-1 protein kinase. *Mol.Cell.Biol.* 1997 Feb;17(2):732-741.

Calera MR, Martinez C, Liu H, Jack AK, Birnbaum MJ, Pilch PF. Insulin increases the association of Akt-2 with Glut4-containing vesicles. *J.Biol.Chem.* 1998 Mar 27;273(13):7201-7204.

Caligaris-Cappio F, Ghia P. Novel insights in chronic lymphocytic leukemia: are we getting closer to understanding the pathogenesis of the disease? *J.Clin.Oncol.* 2008 Sep 20;26(27):4497-4503.

Calin GA, Croce CM. Genomics of chronic lymphocytic leukemia microRNAs as new players with clinical significance. *Semin.Oncol.* 2006 Apr;33(2):167-173.

Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2002 Nov 26;99(24):15524-15529.

Calleja V, Laguerre M, Parker PJ, Larijani B. Role of a novel PH-kinase domain interface in PKB/Akt regulation: structural mechanism for allosteric inhibition. *PLoS Biol.* 2009 Jan 20;7(1):e17.

Campbell M, Allen WE, Sawyer C, Vanhaesebroeck B, Trimble ER. Glucose-potentiated chemotaxis in human vascular smooth muscle is dependent on cross-talk between the PI3K and MAPK signaling pathways. *Circ.Res.* 2004 Aug 20;95(4):380-388.

Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, et al. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 1998 Nov 13;282(5392):1318-1321.

Carpten JD, Faber AL, Horn C, Donoho GP, Briggs SL, Robbins CM, et al. A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature* 2007 Jul 26;448(7152):439-444.

Carreras J, Villamor N, Colomo L, Moreno C, Ramon y Cajal S, Crespo M, et al. Immunohistochemical analysis of ZAP-70 expression in B-cell lymphoid neoplasms. *J.Pathol.* 2005 Mar;205(4):507-513.

Casamayor A, Morrice NA, Alessi DR. Phosphorylation of Ser-241 is essential for the activity of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1: identification of five sites of phosphorylation in vivo. *Biochem.J.* 1999 Sep 1;342 (Pt 2)(Pt 2):287-292.

Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U, Nishizuka Y. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J.Biol.Chem.* 1982;257(13):7847-7851.

Catovsky D, Fooks J, Richards S. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia: the importance of age, sex and response to treatment in survival. A report from the MRC CLL 1 trial. MRC Working Party on Leukaemia in Adults. *Br.J.Haematol.* 1989 Jun;72(2):141-149.

Chan TO, Rittenhouse SE, Tschlis PN. AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Annu.Rev.Biochem.* 1999;68:965-1014.

Chang TC, Wentzel EA, Kent OA, Ramachandran K, Mullendore M, Lee KH, et al. Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol.Cell* 2007 Jun 8;26(5):745-752.

Chen D, Gould C, Garza R, Gao T, Hampton RY, Newton AC. Amplitude control of protein kinase C by RINCK, a novel E3 ubiquitin ligase. *J.Biol.Chem.* 2007 Nov 16;282(46):33776-33787.

Chen J, McMillan NA. Molecular basis of pathogenesis, prognosis and therapy in chronic lymphocytic leukaemia. *Cancer.Biol.Ther.* 2008 Feb;7(2):174-179.

Chiorazzi N. Cell proliferation and death: forgotten features of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Best Pract.Res.Clin.Haematol.* 2007 Sep;20(3):399-413.

Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N.Engl.J.Med.* 2005 Feb 24;352(8):804-815.

Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, Green DR. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death Differ.* 2006 Aug;13(8):1396-1402.

Christian SL, Sims PV, Gold MR. The B cell antigen receptor regulates the transcriptional activator beta-catenin via protein kinase C-mediated inhibition of glycogen synthase kinase-3. *J.Immunol.* 2002 Jul 15;169(2):758-769.

Clayton E, Bardi G, Bell SE, Chantry D, Downes CP, Gray A, et al. A crucial role for the p110delta subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in B cell development and activation. *J.Exp.Med.* 2002 Sep 16;196(6):753-763.

Cleary ML, Sklar J. Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint-cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1985 Nov;82(21):7439-7443.

Coenen S, Pickering B, Potter KN, Johnson PW, Stevenson FK, Packham G. The relevance of sequence insertions in the Mcl-1 promoter in chronic lymphocytic leukemia and in normal cells. *Haematologica* 2005 Sep;90(9):1285-1286.

Coll-Mulet L, Iglesias-Serret D, Santidrian AF, Cosialls AM, de Frias M, Castano E, et al. MDM2 antagonists activate p53 and synergize with genotoxic drugs in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2006 May 15;107(10):4109-4114.

Coll-Mulet L, Santidrian AF, Cosialls AM, Iglesias-Serret D, de Frias M, Grau J, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification for detection of genomic alterations in chronic lymphocytic leukaemia. *Br.J.Haematol.* 2008 Sep;142(5):793-801.

Condliffe AM, Davidson K, Anderson KE, Ellson CD, Crabbe T, Okkenhaug K, et al. Sequential activation of class IB and class IA PI3K is important for the primed respiratory burst of human but not murine neutrophils. *Blood* 2005 Aug 15;106(4):1432-1440.

Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N.Engl.J.Med.* 2003 May 1;348(18):1764-1775.

BIBLIOGRAFIA

Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 1995 Dec 21-28;378(6559):785-789.

Cuneo A, Rigolin GM, Bigoni R, De Angeli C, Veronese A, Cavazzini F, et al. Chronic lymphocytic leukemia with 6q- shows distinct hematological features and intermediate prognosis. *Leukemia* 2004 Mar;18(3):476-483.

Cuni S, Perez-Aciego P, Perez-Chacon G, Vargas JA, Sanchez A, Martin-Saavedra FM, et al. A sustained activation of PI3K/NF-kappaB pathway is critical for the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia* 2004 Aug;18(8):1391-1400.

D

Dameshek W. Chronic lymphocytic leukemia--an accumulative disease of immunologically incompetent lymphocytes. *Blood* 1967 Apr;29(4):Suppl:566-84.

Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999 Sep 15;94(6):1840-1847.

Dancescu M, Rubio-Trujillo M, Biron G, Bron D, Delespesse G, Sarfati M. Interleukin 4 protects chronic lymphocytic leukemic B cells from death by apoptosis and upregulates Bcl-2 expression. *J.Exp.Med.* 1992 Nov 1;176(5):1319-1326.

Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 2004 Jan 23;116(2):205-219.

Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997 Oct 17;91(2):231-241.

Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem.J.* 2000 Oct 1;351(Pt 1):95-105.

Dearden C. Disease-specific complications of chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am.Soc.Hematol.Educ.Program.* 2008:450-456.

Del Prete A, Vermi W, Dander E, Otero K, Barberis L, Luini W, et al. Defective dendritic cell migration and activation of adaptive immunity in PI3Kgamma-deficient mice. *EMBO J.* 2004 Sep 1;23(17):3505-3515.

Delmas D, Rebe C, Micheau O, Athias A, Gambert P, Grazide S, et al. Redistribution of CD95, DR4 and DR5 in rafts accounts for the synergistic toxicity of resveratrol and death receptor ligands in colon carcinoma cells. *Oncogene* 2004 Nov 25;23(55):8979-8986.

Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR, Van Arsdale T, Zhou Q, Srinivasula SM, et al. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J.* 1998 Apr 15;17(8):2215-2223.

Dewald GW, Brockman SR, Paternoster SF, Bone ND, O'Fallon JR, Allmer C, et al. Chromosome anomalies detected by interphase fluorescence in situ hybridization: correlation with significant biological features of B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br.J.Haematol.* 2003 Apr;121(2):287-295.

Di Cristofano A, Pesce B, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP. Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nat.Genet.* 1998 Aug;19(4):348-355.

Dighiero G, Maloum K, Desablens B, Cazin B, Navarro M, Leblay R, et al. Chlorambucil in indolent chronic lymphocytic leukemia. French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia. *N.Engl.J.Med.* 1998 May 21;338(21):1506-1514.

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 Oct 5;10(19):1201-1204.

Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N.Engl.J.Med.* 2000 Dec 28;343(26):1910-1916.

Draghetti C, Salvat C, Zanoquera F, Curchod ML, Vignaud C, Peixoto H, et al. Functional whole-genome analysis identifies Polo-like kinase 2 and poliovirus receptor as essential for neuronal differentiation upstream of the negative regulator alphaB-crystallin. *J.Biol.Chem.* 2009 Nov 13;284(46):32053-32065.

Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000 Jul 7;102(1):33-42.

Dummler B, Hemmings BA. Physiological roles of PKB/Akt isoforms in development and disease. *Biochem.Soc.Trans.* 2007 Apr;35(Pt 2):231-235.

E

Eckelman BP, Salvesen GS. The human anti-apoptotic proteins cIAP1 and cIAP2 bind but do not inhibit caspases. *J.Biol.Chem.* 2006 Feb 10;281(6):3254-3260.

el Rouby S, Thomas A, Costin D, Rosenberg CR, Potmesil M, Silber R, et al. p53 gene mutation in B-cell chronic lymphocytic leukemia is associated with drug resistance and is independent of MDR1/MDR3 gene expression. *Blood* 1993 Dec 1;82(11):3452-3459.

Eldering E, Spek CA, Abernethy HL, Grummels A, Derks IA, de Vos AF, et al. Expression profiling via novel multiplex assay allows rapid assessment of gene regulation in defined signalling pathways. *Nucleic Acids Res.* 2003 Dec 1;31(23):e153.

Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat.Rev.Cancer.* 2009 Aug;9(8):550-562.

Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat.Rev.Genet.* 2006 Aug;7(8):606-619.

F

Facchinetti V, Ouyang W, Wei H, Soto N, Lazorchak A, Gould C, et al. The mammalian target of rapamycin complex 2 controls folding and stability of Akt and protein kinase C. *EMBO J.* 2008 Jul 23;27(14):1932-1943.

Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, Pearson A, Ezekewitz RA, Henson PM. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* 2000 May 4;405(6782):85-90.

Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J.Immunol.* 1992 Apr 1;148(7):2207-2216.

Fenaux P, Preudhomme C, Lai JL, Quiquandon I, Jonveaux P, Vanrumbeke M, et al. Mutations of the p53 gene in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a report on 39 cases with cytogenetic analysis. *Leukemia* 1992 Apr;6(4):246-250.

Feng J, Park J, Cron P, Hess D, Hemmings BA. Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase. *J.Biol.Chem.* 2004 Sep 24;279(39):41189-41196.

BIBLIOGRAFIA

Flinn lea. Preliminary evidence of clinical activity in a phase I study of CAL-101, a selective inhibitor of the p110 δ isoform of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), in patients with select hematologic malignancies. *J. Clin. Oncol.* 2009;27 (Supl.):3543.

Forbes IJ, Zalewski PD, Giannakis C, Cowled PA. Induction of apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells and its prevention by phorbol ester. *Exp.Cell Res.* 1992 Feb;198(2):367-372.

Franke TF, Hornik CP, Segev L, Shostak GA, Sugimoto C. PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene* 2003 Dec 8;22(56):8983-8998.

Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC, Toker A. Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science* 1997 Jan 31;275(5300):665-668.

Franke TF, Yang SI, Chan TO, Datta K, Kazlauskas A, Morrison DK, et al. The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell* 1995 Jun 2;81(5):727-736.

Freeley M, Volkov Y, Kelleher D, Long A. Stimulus-induced phosphorylation of PKC theta at the C-terminal hydrophobic-motif in human T lymphocytes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2005 Aug 26;334(2):619-630.

Fuentes-Prior P, Salvesen GS. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem.J.* 2004 Dec 1;384(Pt 2):201-232.

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 Feb 15;164(4):2200-2206.

G

Gajate C, Del Canto-Janez E, Acuna AU, Amat-Guerri F, Geijo E, Santos-Beneit AM, et al. Intracellular triggering of Fas aggregation and recruitment of apoptotic molecules into Fas-enriched rafts in selective tumor cell apoptosis. *J.Exp.Med.* 2004 Aug 2;200(3):353-365.

Gajate C, Gonzalez-Camacho F, Mollinedo F. Involvement of raft aggregates enriched in Fas/CD95 death-inducing signaling complex in the antileukemic action of edelfosine in Jurkat cells. *PLoS One* 2009a;4(4):e5044.

Gajate C, Gonzalez-Camacho F, Mollinedo F. Lipid raft connection between extrinsic and intrinsic apoptotic pathways. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2009b Mar 20;380(4):780-784.

Gajate C, Mollinedo F. The antitumor ether lipid ET-18-OCH(3) induces apoptosis through translocation and capping of Fas/CD95 into membrane rafts in human leukemic cells. *Blood* 2001 Dec 15;98(13):3860-3863.

Gajate C, Mollinedo F. Cytoskeleton-mediated death receptor and ligand concentration in lipid rafts forms apoptosis-promoting clusters in cancer chemotherapy. *J.Biol.Chem.* 2005 Mar 25;280(12):11641-11647.

Gajate C, Mollinedo F. Edelfosine and perifosine induce selective apoptosis in multiple myeloma by recruitment of death receptors and downstream signaling molecules into lipid rafts. *Blood* 2007 Jan 15;109(2):711-719.

Gajate C, Santos-Beneit AM, Macho A, Lazaro M, Hernandez-De Rojas A, Modolell M, et al. Involvement of mitochondria and caspase-3 in ET-18-OCH(3)-induced apoptosis of human leukemic cells. *Int.J.Cancer* 2000 Apr 15;86(2):208-218.

Galton DA. The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Can.Med.Assoc.J.* 1966 May 7;94(19):1005-1010.

- Gamell C, Osses N, Bartrons R, Rückle T, Camps M, Rosa JL, Ventura F. BMP2 induction of actin cytoskeleton reorganization and cell migration requires PI3-kinase and Cdc42 activity. *J Cell Sci.* 2008 Dec 1;121(Pt 23):3960-70.
- Gao T, Brognard J, Newton AC. The phosphatase PHLPP controls the cellular levels of protein kinase C. *J.Biol.Chem.* 2008 Mar 7;283(10):6300-6311.
- Gao T, Furnari F, Newton AC. PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol.Cell* 2005 Apr 1;18(1):13-24.
- Gardai SJ, Hildeman DA, Frankel SK, Whitlock BB, Frasch SC, Borregaard N, et al. Phosphorylation of Bax Ser184 by Akt regulates its activity and apoptosis in neutrophils. *J.Biol.Chem.* 2004 May 14;279(20):21085-21095.
- Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, Kroemer G. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ.* 2006 Sep;13(9):1423-1433.
- Geng L, Tan J, Himmelfarb E, Schueneman A, Niermann K, Brousal J, et al. A specific antagonist of the p110delta catalytic component of phosphatidylinositol 3'-kinase, IC486068, enhances radiation-induced tumor vascular destruction. *Cancer Res.* 2004 Jul 15;64(14):4893-4899.
- Gescher A. Analogs of staurosporine: potential anticancer drugs? *Gen.Pharmacol.* 1998 Nov;31(5):721-728.
- Glassman AB, Harper-Allen EA, Hayes KJ, Hopwood VL, Gutterman EE, Zagryn SP. Chromosome 6 abnormalities associated with prolymphocytic acceleration in chronic lymphocytic leukemia. *Ann.Clin.Lab.Sci.* 1998 Jan-Feb;28(1):24-29.
- Gliki G, Wheeler-Jones C, Zachary I. Vascular endothelial growth factor induces protein kinase C (PKC)-dependent Akt/PKB activation and phosphatidylinositol 3'-kinase-mediated PKC delta phosphorylation: role of PKC in angiogenesis. *Cell Biol.Int.* 2002;26(9):751-759.
- Goldin LR, Caporaso NE. Family studies in chronic lymphocytic leukaemia and other lymphoproliferative tumours. *Br.J.Haematol.* 2007a Dec;139(5):774-779.
- Goldin LR, Slager SL. Familial CLL: genes and environment. *Hematology Am.Soc.Hematol.Educ.Program.* 2007b:339-345.
- Graupera M, Guillermet-Guibert J, Foukas LC, Phng LK, Cain RJ, Salpekar A, et al. Angiogenesis selectively requires the p110alpha isoform of PI3K to control endothelial cell migration. *Nature* 2008 May 29;453(7195):662-666.
- Green DR, Evan GI. A matter of life and death. *Cancer.Cell.* 2002 Feb;1(1):19-30.
- Gribben JG. How I treat CLL upfront. *Blood* 2009 Oct 22.
- Griner EM, Kazanietz MG. Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nat.Rev.Cancer.* 2007 Apr;7(4):281-294.
- Guillermet-Guibert J, Bjorklof K, Salpekar A, Gonella C, Ramadani F, Bilancio A, et al. The p110beta isoform of phosphoinositide 3-kinase signals downstream of G protein-coupled receptors and is functionally redundant with p110gamma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2008 Jun 17;105(24):8292-8297.
- Gukovsky I, Cheng JH, Nam KJ, Lee OT, Lugea A, Fischer L, et al. Phosphatidylinositide 3-kinase gamma regulates key pathologic responses to cholecystokinin in pancreatic acinar cells. *Gastroenterology* 2004 Feb;126(2):554-566.

H

Hallaert DY, Spijker R, Jak M, Derks IA, Alves NL, Wensveen FM, et al. Crosstalk among Bcl-2 family members in B-CLL: seliciclib acts via the Mcl-1/Noxa axis and gradual exhaustion of Bcl-2 protection. *Cell Death Differ.* 2007 Nov;14(11):1958-1967.

Hallek M, Fingerle-Rowson G, Fink AM, Busch R, Mayer J, Hensel M, et al. First-Line Treatment with Fludarabine (F), Cyclophosphamide (C), and Rituximab (R) (FCR) Improves Overall Survival (OS) in Previously Untreated Patients (pts) with Advanced Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL): Results of a Randomized Phase III Trial On Behalf of An International Group of Investigators and the German CLL Study Group. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*, Nov 2009; 114: 535.

Hamblin AD, Hamblin TJ. The immunodeficiency of chronic lymphocytic leukaemia. *Br.Med.Bull.* 2008;87:49-62.

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 Sep 15;94(6):1848-1854.

Han EK, Levenson JD, McGonigal T, Shah OJ, Woods KW, Hunter T, et al. Akt inhibitor A-443654 induces rapid Akt Ser-473 phosphorylation independent of mTORC1 inhibition. *Oncogene* 2007 Aug 16;26(38):5655-5661.

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 Sep 15;82(6):1820-1828.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000 Jan 7;100(1):57-70.

Hawkins PT, Anderson KE, Davidson K, Stephens LR. Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells. *Biochem.Soc.Trans.* 2006 Nov;34(Pt 5):647-662.

He L, He X, Lim LP, de Stanchina E, Xuan Z, Liang Y, et al. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* 2007 Jun 28;447(7148):1130-1134.

Hengartner MO, Horvitz HR. *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. *Cell* 1994 Feb 25;76(4):665-676.

Henley T, Kovcsdi D, Turner M. B-cell responses to B-cell activation factor of the TNF family (BAFF) are impaired in the absence of PI3K delta. *Eur.J.Immunol.* 2008 Dec;38(12):3543-3548.

Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat.Rev.Drug Discov.* 2005 Dec;4(12):988-1004.

Herling M, Patel KA, Khalili J, Schlette E, Kobayashi R, Medeiros LJ, et al. TCL1 shows a regulated expression pattern in chronic lymphocytic leukemia that correlates with molecular subtypes and proliferative state. *Leukemia* 2006 Feb;20(2):280-285.

Herling M, Patel KA, Weit N, Lillenthal N, Hallek M, Keating MJ, et al. High TCL1 levels are a marker of B-cell receptor pathway responsiveness and adverse outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2009 Nov 19;114(21):4675-4686.

Hideshima T, Catley L, Yasui H, Ishitsuka K, Raje N, Mitsiades C, et al. Perifosine, an oral bioactive novel alkylphospholipid, inhibits Akt and induces in vitro and in vivo cytotoxicity in human multiple myeloma cells. *Blood* 2006 May 15;107(10):4053-4062.

Hill K, Welte S, Yu J, Murray JT, Yip SC, Condeelis JS, et al. Specific requirement for the p85-p110alpha phosphatidylinositol 3-kinase during epidermal growth factor-stimulated actin nucleation in breast cancer cells. *J.Biol.Chem.* 2000 Feb 11;275(6):3741-3744.

Hirsch E, Katanaev VL, Garlanda C, Azzolino O, Pirola L, Silengo L, et al. Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science* 2000 Feb 11;287(5455):1049-1053.

Holler C, Pinon JD, Denk U, Heyder C, Hofbauer S, Greil R, et al. PKCbeta is essential for the development of chronic lymphocytic leukemia in the TCL1 transgenic mouse model: validation of PKCbeta as a therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2009 Mar 19;113(12):2791-2794.

Houlston RS, Sellick G, Yuille M, Matutes E, Catovsky D. Causation of chronic lymphocytic leukemia--insights from familial disease. *Leuk.Res.* 2003 Oct;27(10):871-876.

Hsu YT, Wolter KG, Youle RJ. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1997 Apr 15;94(8):3668-3672.

Hu X, Haney N, Kropp D, Kabore AF, Johnston JB, Gibson SB. Lysophosphatidic acid (LPA) protects primary chronic lymphocytic leukemia cells from apoptosis through LPA receptor activation of the anti-apoptotic protein AKT/PKB. *J.Biol.Chem.* 2005 Mar 11;280(10):9498-9508.

Huhn D, von Schilling C, Wilhelm M, Ho AD, Hallek M, Kuse R, et al. Rituximab therapy of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001 Sep 1;98(5):1326-1331.

I

Iglesias-Serret D, Coll-Mulet L, Santidrian AF, Navarro-Sabate A, Domingo A, Pons G, et al. Re: Prognostic significance of a short sequence insertion in the MCL-1 promoter in chronic lymphocytic leukemia. *J.Natl.Cancer Inst.* 2005 Jul 20;97(14):1090-1; author reply 1093-5.

Iglesias-Serret D, de Frias M, Santidrian AF, Coll-Mulet L, Cosialls AM, Barragan M, et al. Regulation of the proapoptotic BH3-only protein BIM by glucocorticoids, survival signals and proteasome in chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* 2007 Feb;21(2):281-287.

Ikenoue T, Inoki K, Yang Q, Zhou X, Guan KL. Essential function of TORC2 in PKC and Akt turn motif phosphorylation, maturation and signalling. *EMBO J.* 2008 Jul 23;27(14):1919-1931.

Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 1997 Jul 10;388(6638):190-195.

J

Jackson SP, Schoenwaelder SM, Goncalves I, Nesbitt WS, Yap CL, Wright CE, et al. PI 3-kinase p110beta: a new target for antithrombotic therapy. *Nat.Med.* 2005 May;11(5):507-514.

Jennings CD, Foon KA. Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy. *Blood* 1997 Oct 15;90(8):2863-2892.

Jia S, Liu Z, Zhang S, Liu P, Zhang L, Lee SH, et al. Essential roles of PI(3)K-p110beta in cell growth, metabolism and tumorigenesis. *Nature* 2008 Aug 7;454(7205):776-779.

Jirousek MR, Gillig JR, Gonzalez CM, Heath WF, McDonald JH,3rd, Neel DA, et al. (S)-13-[(dimethylamino)methyl]-10,11,14,15-tetrahydro-4,9:16, 21-dimetheno-1H, 13H-dibenzo[e,k]pyrrolo[3,4-h][1,4,13]oxadiazacyclohexadecene-1,3(2H)-dione (LY333531) and related analogues: isozyme selective inhibitors of protein kinase C beta. *J.Med.Chem.* 1996 Jul 5;39(14):2664-2671.

Johnson AJ, Lucas DM, Muthusamy N, Smith LL, Edwards RB, De Lay MD, et al. Characterization of the TCL-1 transgenic mouse as a preclinical drug development tool for human chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006 Aug 15;108(4):1334-1338.

BIBLIOGRAFIA

Jones DT, Ganeshaguru K, Anderson RJ, Jackson TR, Bruckdorfer KR, Low SY, et al. Albumin activates the AKT signaling pathway and protects B-chronic lymphocytic leukemia cells from chlorambucil- and radiation-induced apoptosis. *Blood* 2003 Apr 15;101(8):3174-3180.

Jou ST, Carpino N, Takahashi Y, Piekorz R, Chao JR, Carpino N, et al. Essential, nonredundant role for the phosphoinositide 3-kinase p110delta in signaling by the B-cell receptor complex. *Mol.Cell.Biol.* 2002 Dec;22(24):8580-8591.

Jurlander J. The cellular biology of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Crit.Rev.Oncol.Hematol.* 1998 Jan;27(1):29-52.

K

Karakas B, Bachman KE, Park BH. Mutation of the PIK3CA oncogene in human cancers. *Br.J.Cancer* 2006 Feb 27;94(4):455-459.

Karin M, Lin A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat.Immunol.* 2002 Mar;3(3):221-227.

Kater AP, Evers LM, Remmerswaal EB, Jaspers A, Oosterwijk MF, van Lier RA, et al. CD40 stimulation of B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells enhances the anti-apoptotic profile, but also Bid expression and cells remain susceptible to autologous cytotoxic T-lymphocyte attack. *Br.J.Haematol.* 2004 Nov;127(4):404-415.

Kawakami Y, Nishimoto H, Kitaura J, Maeda-Yamamoto M, Kato RM, Littman DR, et al. Protein kinase C beta11 regulates Akt phosphorylation on Ser-473 in a cell type- and stimulus-specific fashion. *J.Biol.Chem.* 2004 Nov 12;279(46):47720-47725.

Keating MJ. Immunosuppression with purine analogues--the flip side of the gold coin. *Ann.Oncol.* 1993 May;4(5):347-348.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br.J.Cancer* 1972 Aug;26(4):239-257.

Kienle DL, Korz C, Hosch B, Benner A, Mertens D, Habermann A, et al. Evidence for distinct pathomechanisms in genetic subgroups of chronic lymphocytic leukemia revealed by quantitative expression analysis of cell cycle, activation, and apoptosis-associated genes. *J.Clin.Oncol.* 2005 Jun 1;23(16):3780-3792.

Kiessling S, Lutz-Nicoladoni C, Olsson A, Niederegger H, Baier G, Villunger A. Compensatory mechanisms regulate the Bcl-2 rheostat and lymphocyte survival in the absence of AKT1/PKBalpha. *Cell Death Differ.* 2007 Jan;14(1):186-189.

Kim AH, Khursigara G, Sun X, Franke TF, Chao MV. Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol.Cell.Biol.* 2001 Feb;21(3):893-901.

Kim DW, Hwang JH, Suh JM, Kim H, Song JH, Hwang ES, et al. RET/PTC (rearranged in transformation/papillary thyroid carcinomas) tyrosine kinase phosphorylates and activates phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1): an alternative phosphatidylinositol 3-kinase-independent pathway to activate PDK1. *Mol.Endocrinol.* 2003 Jul;17(7):1382-1394.

Kim R, Tanabe K, Uchida Y, Emi M, Inoue H, Toge T. Current status of the molecular mechanisms of anticancer drug-induced apoptosis. The contribution of molecular-level analysis to cancer chemotherapy. *Cancer Chemother.Pharmacol.* 2002 Nov;50(5):343-352.

Kim S, Jin J, Kunapuli SP. Akt activation in platelets depends on Gi signaling pathways. *J.Biol.Chem.* 2004 Feb 6;279(6):4186-4195.

Kipps TJ. Immunobiology of chronic lymphocytic leukemia. *Curr.Opin.Hematol.* 2003 Jul;10(4):312-318.

Kitada S, Andersen J, Akar S, Zapata JM, Takayama S, Krajewski S, et al. Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with In vitro and In vivo chemoresponses. *Blood* 1998 May 1;91(9):3379-3389.

Kitada S, Zapata JM, Andreeff M, Reed JC. Bryostatin and CD40-ligand enhance apoptosis resistance and induce expression of cell survival genes in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br.J.Haematol.* 1999 Sep;106(4):995-1004.

Klippel A, Kavanaugh WM, Pot D, Williams LT. A specific product of phosphatidylinositol 3-kinase directly activates the protein kinase Akt through its pleckstrin homology domain. *Mol.Cell.Biol.* 1997 Jan;17(1):338-344.

Knight ZA, Gonzalez B, Feldman ME, Zunder ER, Goldenberg DD, Williams O, et al. A pharmacological map of the PI3-K family defines a role for p110alpha in insulin signaling. *Cell* 2006 May 19;125(4):733-747.

Kohn AD, Summers SA, Birnbaum MJ, Roth RA. Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J.Biol.Chem.* 1996 Dec 6;271(49):31372-31378.

Kojima K, Shimanuki M, Shikami M, Samudio IJ, Ruvolo V, Corn P, et al. The dual PI3 kinase/mTOR inhibitor PI-103 prevents p53 induction by Mdm2 inhibition but enhances p53-mediated mitochondrial apoptosis in p53 wild-type AML. *Leukemia* 2008 Sep;22(9):1728-1736.

Kondapaka SB, Singh SS, Dasmahapatra GP, Sausville EA, Roy KK. Perifosine, a novel alkylphospholipid, inhibits protein kinase B activation. *Mol.Cancer.Ther.* 2003 Nov;2(11):1093-1103.

Kovacina KS, Park GY, Bae SS, Guzzetta AW, Schaefer E, Birnbaum MJ, et al. Identification of a proline-rich Akt substrate as a 14-3-3 binding partner. *J.Biol.Chem.* 2003 Mar 21;278(12):10189-10194.

Kozikowski AP, Sun H, Brognard J, Dennis PA. Novel PI analogues selectively block activation of the pro-survival serine/threonine kinase Akt. *J.Am.Chem.Soc.* 2003 Feb 5;125(5):1144-1145.

Krajewski S, Tanaka S, Takayama S, Schibler MJ, Fenton W, Reed JC. Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res.* 1993 Oct 1;53(19):4701-4714.

Kroner C, Eybrechts K, Akkerman JW. Dual regulation of platelet protein kinase B. *J.Biol.Chem.* 2000 Sep 8;275(36):27790-27798.

Kuida K, Haydar TF, Kuan CY, Gu Y, Taya C, Karasuyama H, et al. Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell* 1998 Aug 7;94(3):325-337.

L

Labi V, Erlacher M, Kiessling S, Villunger A. BH3-only proteins in cell death initiation, malignant disease and anticancer therapy. *Cell Death Differ.* 2006 Aug;13(8):1325-1338.

Lacour S, Hammann A, Grazide S, Lagadic-Gossmann D, Athias A, Sergent O, et al. Cisplatin-induced CD95 redistribution into membrane lipid rafts of HT29 human colon cancer cells. *Cancer Res.* 2004 May 15;64(10):3593-3598.

BIBLIOGRAFIA

- Laine J, Kunstle G, Obata T, Sha M, Noguchi M. The protooncogene TCL1 is an Akt kinase coactivator. *Mol.Cell* 2000 Aug;6(2):395-407.
- Le Good JA, Ziegler WH, Parekh DB, Alessi DR, Cohen P, Parker PJ. Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science* 1998 Sep 25;281(5385):2042-2045.
- Lee HW, Smith L, Pettit GR, Smith JB. Bryostatins 1 and phorbol ester down-modulate protein kinase C- α and - ϵ via the ubiquitin/proteasome pathway in human fibroblasts. *Mol.Pharmacol.* 1997 Mar;51(3):439-447.
- Leupin N, Cenni B, Novak U, Hugli B, Graber HU, Tobler A, et al. Disparate expression of the PTEN gene: a novel finding in B-cell chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL). *Br.J.Haematol.* 2003 Apr;121(1):97-100.
- Leverrier Y, Okkenhaug K, Sawyer C, Bilancio A, Vanhaesebroeck B, Ridley AJ. Class I phosphoinositide 3-kinase p110 β is required for apoptotic cell and Fc γ receptor-mediated phagocytosis by macrophages. *J.Biol.Chem.* 2003 Oct 3;278(40):38437-38442.
- Li S, Phong M, Lahn M, Brail L, Sutton S, Lin BK, et al. Retrospective analysis of protein kinase C- β (PKC- β) expression in lymphoid malignancies and its association with survival in diffuse large B-cell lymphomas. *Biol.Direct* 2007 Feb 21;2:8.
- Li W, Zhang J, Flechner L, Hyun T, Yam A, Franke TF, et al. Protein kinase C- α overexpression stimulates Akt activity and suppresses apoptosis induced by interleukin 3 withdrawal. *Oncogene* 1999 Nov 11;18(47):6564-6572.
- Li Z, Jiang H, Xie W, Zhang Z, Smrcka AV, Wu D. Roles of PLC- β 2 and - β 3 and PI3K γ in chemoattractant-mediated signal transduction. *Science* 2000 Feb 11;287(5455):1046-1049.
- Liang J, Zubovitz J, Petrocelli T, Kotchetkov R, Connor MK, Han K, et al. PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nat.Med.* 2002 Oct;8(10):1153-1160.
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996 Jul 12;86(1):147-157.
- Logie L, Ruiz-Alcaraz AJ, Keane M, Woods YL, Bain J, Marquez R, et al. Characterization of a protein kinase B inhibitor in vitro and in insulin-treated liver cells. *Diabetes* 2007 Sep;56(9):2218-2227.
- Longo PG, Laurenti L, Gobessi S, Petlickovski A, Pelosi M, Chiusolo P, et al. The Akt signaling pathway determines the different proliferative capacity of chronic lymphocytic leukemia B-cells from patients with progressive and stable disease. *Leukemia* 2007 Jan;21(1):110-120.
- Longo PG, Laurenti L, Gobessi S, Sica S, Leone G, Efremov DG. The Akt/Mcl-1 pathway plays a prominent role in mediating antiapoptotic signals downstream of the B-cell receptor in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 2008 Jan 15;111(2):846-855.
- Loseke S, Grage-Griebenow E, Wagner A, Gehlhar K, Bufe A. Differential expression of IFN- α subtypes in human PBMC: evaluation of novel real-time PCR assays. *J.Immunol.Methods* 2003 May 1;276(1-2):207-222.
- Lu Z, Jiang YP, Wang W, Xu XH, Mathias RT, Entcheva E, et al. Loss of cardiac phosphoinositide 3-kinase p110 α results in contractile dysfunction. *Circulation* 2009 Jul 28;120(4):318-325.
- Lu Z, Liu D, Hornia A, Devonish W, Pagano M, Foster DA. Activation of protein kinase C triggers its ubiquitination and degradation. *Mol.Cell.Biol.* 1998 Feb;18(2):839-845.

Luo Y, Shoemaker AR, Liu X, Woods KW, Thomas SA, de Jong R, et al. Potent and selective inhibitors of Akt kinases slow the progress of tumors in vivo. *Mol.Cancer.Ther.* 2005 Jun;4(6):977-986.

M

MacFarlane M, Harper N, Snowden RT, Dyer MJ, Barnett GA, Pringle JH, et al. Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in primary B cell chronic lymphocytic leukaemia. *Oncogene* 2002 Oct 3;21(44):6809-6818.

Mackay HJ, Twelves CJ. Targeting the protein kinase C family: are we there yet? *Nat.Rev.Cancer.* 2007 Jul;7(7):554-562.

Mackus WJ, Kater AP, Grummels A, Evers LM, Hooijbrink B, Kramer MH, et al. Chronic lymphocytic leukemia cells display p53-dependent drug-induced Puma upregulation. *Leukemia* 2005 Mar;19(3):427-434.

Mahmoud IS, Sughayer MA, Mohammad HA, Awidi AS, EL-Khateeb MS, Ismail SI. The transforming mutation E17K/AKT1 is not a major event in B-cell-derived lymphoid leukaemias. *Br.J.Cancer* 2008 Aug 5;99(3):488-490.

Manning BD. Balancing Akt with S6K: implications for both metabolic diseases and tumorigenesis. *J.Cell Biol.* 2004 Nov 8;167(3):399-403.

Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 2007 Jun 29;129(7):1261-1274.

Mariano MT, Moretti L, Donelli A, Grantini M, Montagnani G, Di Prisco AU, et al. Bcl-2 Gene Expression in Hematopoietic Cell Differentiation. *Blood* 1992 Aug 1;80(3):768-775.

Markman B, Atzori F, Perez-Garcia J, Tabernero J, Baselga J. Status of PI3K inhibition and biomarker development in cancer therapeutics. *Ann.Oncol.* 2009 Aug 27.

Marques M, Kumar A, Poveda AM, Zuluaga S, Hernandez C, Jackson S, et al. Specific function of phosphoinositide 3-kinase beta in the control of DNA replication. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2009 May 5;106(18):7525-7530.

Marshall CJ. Cell signalling. Raf gets it together. *Nature* 1996 Sep 12;383(6596):127-128.

Marte BM, Downward J. PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. *Trends Biochem.Sci.* 1997 Sep;22(9):355-358.

Martins LR, Lúcio P, Gameiro P, Gomes Silva M, Barata JT. Targeting CK2 Overexpression as a Novel Therapeutic Tool in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*, Nov 2009; 114: 803.

Martoriati A, Doumont G, Alcalay M, Bellefroid E, Pelicci PG, Marine JC. dapk1, encoding an activator of a p19ARF-p53-mediated apoptotic checkpoint, is a transcription target of p53. *Oncogene* 2005 Feb 17;24(8):1461-1466.

Maurer U, Charvet C, Wagman AS, Dejardin E, Green DR. Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1. *Mol.Cell* 2006 Mar 17;21(6):749-760.

Mayo LD, Donner DB. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2001 Sep 25;98(20):11598-11603.

BIBLIOGRAFIA

Medema RH, Kops GJ, Bos JL, Burgering BM. AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature* 2000 Apr 13;404(6779):782-787.

Meier P, Vousden KH. Lucifer's labyrinth--ten years of path finding in cell death. *Mol.Cell* 2007 Dec 14;28(5):746-754.

Merup M, Moreno TC, Heyman M, Ronnberg K, Grander D, Detlofsson R, et al. 6q deletions in acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 1998 May 1;91(9):3397-3400.

Michie AM, Nakagawa R, McCaig AM. Murine models for chronic lymphocytic leukaemia. *Biochem.Soc.Trans.* 2007 Nov;35(Pt 5):1009-1012.

Mollinedo F, Fernandez-Luna JL, Gajate C, Martin-Martin B, Benito A, Martinez-Dalmau R, et al. Selective induction of apoptosis in cancer cells by the ether lipid ET-18-OCH3 (Edelfosine): molecular structure requirements, cellular uptake, and protection by Bcl-2 and Bcl-X(L). *Cancer Res.* 1997 Apr 1;57(7):1320-1328.

Mollinedo F, Gajate C. Fas/CD95 death receptor and lipid rafts: new targets for apoptosis-directed cancer therapy. *Drug Resist Updat* 2006 Feb-Apr;9(1-2):51-73.

Montserrat E, Rozman C. Chronic lymphocytic leukemia: present status. *Ann.Oncol.* 1995 Mar;6(3):219-235.

Morales AA, Olsson A, Celsing F, Osterborg A, Jondal M, Osorio LM. Expression and transcriptional regulation of functionally distinct Bmf isoforms in B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* 2004 Jan;18(1):41-47.

Morales AA, Olsson A, Celsing F, Osterborg A, Jondal M, Osorio LM. High expression of bfl-1 contributes to the apoptosis resistant phenotype in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Int.J.Cancer* 2005 Feb 20;113(5):730-737.

Moshynska O, Sankaran K, Pahwa P, Saxena A. Prognostic significance of a short sequence insertion in the MCL-1 promoter in chronic lymphocytic leukemia. *J.Natl.Cancer Inst.* 2004 May 5;96(9):673-682.

Munzert G, Kirchner D, Stobbe H, Bergmann L, Schmid RM, Dohner H, et al. Tumor necrosis factor receptor-associated factor 1 gene overexpression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: analysis of NF-kappa B/Rel-regulated inhibitors of apoptosis. *Blood* 2002 Nov 15;100(10):3749-3756.

Muzio M, Apollonio B, Scielzo C, Frenquelli M, Vandoni I, Boussiotis V, et al. Constitutive activation of distinct BCR-signaling pathways in a subset of CLL patients: a molecular signature of anergy. *Blood* 2008 Jul 1;112(1):188-195.

N

Nagata S. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp.Cell Res.* 2000 Apr 10;256(1):12-18.

Nakagawa R, Soh JW, Michie AM. Subversion of protein kinase C alpha signaling in hematopoietic progenitor cells results in the generation of a B-cell chronic lymphocytic leukemia-like population in vivo. *Cancer Res.* 2006 Jan 1;66(1):527-534.

Nashed BF, Zhang T, Al-Alwan M, Srinivasan G, Halayko AJ, Okkenhaug K, et al. Role of the phosphoinositide 3-kinase p110delta in generation of type 2 cytokine responses and allergic airway inflammation. *Eur.J.Immunol.* 2007 Feb;37(2):416-424.

Nedellec S, Renaudineau Y, Bordron A, Berthou C, Porakishvili N, Lydyard PM, et al. B cell response to surface IgM cross-linking identifies different prognostic groups of B-chronic lymphocytic leukemia patients. *J.Immunol.* 2005 Mar 15;174(6):3749-3756.

Newcomb EW. P53 gene mutations in lymphoid diseases and their possible relevance to drug resistance. *Leuk.Lymphoma* 1995 Apr;17(3-4):211-221.

Newton AC. Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J.Biol.Chem.* 1995 Dec 1;270(48):28495-28498.

Newton AC. Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *Biochem.J.* 2003 Mar 1;370(Pt 2):361-371.

Newton AC. Lipid activation of protein kinases. *J.Lipid Res.* 2009 Apr;50 Suppl:S266-71.

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 May 28;113(22):5549-5557.

Nieto-Miguel T, Gajate C, Mollinedo F. Differential targets and subcellular localization of antitumor alkyl-lysophospholipid in leukemic versus solid tumor cells. *J.Biol.Chem.* 2006 May 26;281(21):14833-14840.

Nijhawan D, Fang M, Traer E, Zhong Q, Gao W, Du F, et al. Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation. *Genes Dev.* 2003 Jun 15;17(12):1475-1486.

Nishio M, Endo T, Tsukada N, Ohata J, Kitada S, Reed JC, 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 Aug 1;106(3):1012-1020.

Nobukuni T, Joaquin M, Roccio M, Dann SG, Kim SY, Gulati P, et al. Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2005 Oct 4;102(40):14238-14243.

Northcott CA, Hayflick J, Watts SW. Upregulated function of phosphatidylinositol-3-kinase in genetically hypertensive rats: a moderator of arterial hypercontractility. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol.* 2005 Oct;32(10):851-858.

O

O'Brien S. New agents in the treatment of CLL. *Hematology Am.Soc.Hematol.Educ.Program.* 2008:457-464.

O'Connor TW. Phorbol ester-induced loss of colchicine ultrasensitivity in chronic lymphocytic leukaemia lymphocytes. *Leuk.Res.* 1985;9(7):885-895.

Okkenhaug K, Ali K, Vanhaesebroeck B. Antigen receptor signalling: a distinctive role for the p110delta isoform of PI3K. *Trends Immunol.* 2007 Feb;28(2):80-87.

Okkenhaug K, Bilancio A, Farjot G, Priddle H, Sancho S, Peskett E, et al. Impaired B and T cell antigen receptor signaling in p110delta PI 3-kinase mutant mice. *Science* 2002 Aug 9;297(5583):1031-1034.

Okuzumi T, Fiedler D, Zhang C, Gray DC, Aizenstein B, Hoffman R, et al. Inhibitor hijacking of Akt activation. *Nat.Chem.Biol.* 2009 May 24.

BIBLIOGRAFIA

Omura S, Iwai Y, Hirano A, Nakagawa A, Awaya J, Tsuchya H, et al. A new alkaloid AM-2282 OF *Streptomyces* origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization. *J.Antibiot.(Tokyo)* 1977 Apr;30(4):275-282.

Ooms LM, Horan KA, Rahman P, Seaton G, Gurung R, Kethesparan DS, et al. The role of the inositol polyphosphate 5-phosphatases in cellular function and human disease. *Biochem.J.* 2009 Apr 1;419(1):29-49.

Orr JW, Keranen LM, Newton AC. Reversible exposure of the pseudosubstrate domain of protein kinase C by phosphatidylserine and diacylglycerol. *J.Biol.Chem.* 1992 Aug 5;267(22):15263-15266.

Oscier D, Fegan C, Hillmen P, Illidge T, Johnson S, Maguire P, et al. Guidelines on the diagnosis and management of chronic lymphocytic leukaemia. *Br.J.Haematol.* 2004 May;125(3):294-317.

Oudit GY, Sun H, Kerfant BG, Crackower MA, Penninger JM, Backx PH. The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease. *J.Mol.Cell.Cardiol.* 2004 Aug;37(2):449-471.

Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM, Donner DB. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* 1999 Sep 2;401(6748):82-85.

P

Papa V, Tazzari PL, Chiarini F, Cappellini A, Ricci F, Billi AM, et al. Proapoptotic activity and chemosensitizing effect of the novel Akt inhibitor perifosine in acute myelogenous leukemia cells. *Leukemia* 2008 Jan;22(1):147-160.

Papakonstanti EA, Zwaenepoel O, Bilancio A, Burns E, Nock GE, Houseman B, et al. Distinct roles of class IA PI3K isoforms in primary and immortalised macrophages. *J.Cell.Sci.* 2008 Dec 15;121(Pt 24):4124-4133.

Parcellier A, Tintignac LA, Zhuravleva E, Hemmings BA. PKB and the mitochondria: AKTing on apoptosis. *Cell.Signal.* 2008 Jan;20(1):21-30.

Parekh DB, Ziegler W, Parker PJ. Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation. *EMBO J.* 2000 Feb 15;19(4):496-503.

Partovian C, Simons M. Regulation of protein kinase B/Akt activity and Ser473 phosphorylation by protein kinase Calpha in endothelial cells. *Cell.Signal.* 2004 Aug;16(8):951-957.

Pekarsky Y, Koval A, Hallas C, Bichi R, Tresini M, Malstrom S, et al. Tcl1 enhances Akt kinase activity and mediates its nuclear translocation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2000 Mar 28;97(7):3028-3033.

Perez-Chacon G, Vargas JA, Jorda J, Morado M, Rosado S, Martin-Donaire T, et al. CD5 provides viability signals to B cells from a subset of B-CLL patients by a mechanism that involves PKC. *Leuk.Res.* 2007 Feb;31(2):183-193.

Perrino C, Naga Prasad SV, Patel M, Wolf MJ, Rockman HA. Targeted inhibition of beta-adrenergic receptor kinase-1-associated phosphoinositide-3 kinase activity preserves beta-adrenergic receptor signaling and prolongs survival in heart failure induced by calsequestrin overexpression. *J.Am.Coll.Cardiol.* 2005 Jun 7;45(11):1862-1870.

Persad S, Attwell S, Gray V, Mawji N, Deng JT, Leung D, et al. Regulation of protein kinase B/Akt-serine 473 phosphorylation by integrin-linked kinase: critical roles for kinase activity and amino acids arginine 211 and serine 343. *J.Biol.Chem.* 2001 Jul 20;276(29):27462-27469.

Petlickovski A, Laurenti L, Li X, Marietti S, Chiusolo P, Sica S, et al. Sustained signaling through the B-cell receptor induces Mcl-1 and promotes survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 2005 Jun 15;105(12):4820-4827.

Pettitt AR, Sherrington PD, Stewart G, Cawley JC, Taylor AM, Stankovic T. p53 dysfunction in B-cell chronic lymphocytic leukemia: inactivation of ATM as an alternative to TP53 mutation. *Blood* 2001 Aug 1;98(3):814-822.

Plas DR, Thompson CB. Akt-dependent transformation: there is more to growth than just surviving. *Oncogene* 2005 Nov 14;24(50):7435-7442.

Plate JM. PI3-kinase regulates survival of chronic lymphocytic leukemia B-cells by preventing caspase 8 activation. *Leuk.Lymphoma* 2004 Aug;45(8):1519-1529.

Pleyer L, Egle A, Hartmann TN, Greil R. Molecular and cellular mechanisms of CLL: novel therapeutic approaches. *Nat.Rev.Clin.Oncol.* 2009 Jul;6(7):405-418.

Plumas J, Jacob MC, Chaperot L, Molens JP, Sotto JJ, Bensa JC. Tumor B cells from non-Hodgkin's lymphoma are resistant to CD95 (Fas/Apo-1)-mediated apoptosis. *Blood* 1998 Apr 15;91(8):2875-2885.

Pomel V, Klicic J, Covini D, Church DD, Shaw JP, Roulin K, et al. Furan-2-ylmethylene thiazolidinediones as novel, potent, and selective inhibitors of phosphoinositide 3-kinase gamma. *J.Med.Chem.* 2006 Jun 29;49(13):3857-3871.

Pop C, Timmer J, Sperandio S, Salvesen GS. The apoptosome activates caspase-9 by dimerization. *Mol.Cell* 2006 Apr 21;22(2):269-275.

Prevostel C, Martin A, Alvaro V, Jaffiol C, Joubert D. Protein kinase C alpha and tumorigenesis of the endocrine gland. *Horm.Res.* 1997;47(4-6):140-144.

Proto-Siqueira R, Panepucci RA, Careta FP, Lee A, Clear A, Morris K, et al. SAGE analysis demonstrates increased expression of TOSO contributing to Fas-mediated resistance in CLL. *Blood* 2008 Jul 15;112(2):394-397.

Pullen N, Dennis PB, Andjelkovic M, Dufner A, Kozma SC, Hemmings BA, et al. Phosphorylation and activation of p70s6k by PDK1. *Science* 1998 Jan 30;279(5351):707-710.

R

Rai K, Hallek M. Future prospects for alemtuzumab (MabCampath). *Med.Oncol.* 2002;19 Suppl:S57-63.

Rai KR, Peterson BL, Appelbaum FR, Tallman MS, Belch A, Morrison VA, Larson RA. Long-Term Survival Analysis of the North American Intergroup Study C9011 Comparing Fludarabine (F) and Chlorambucil (C) in Previously Untreated Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*, Nov 2009; 114: 536.

Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975 Aug;46(2):219-234.

Raval A, Tanner SM, Byrd JC, Angerman EB, Perko JD, Chen SS, et al. Downregulation of death-associated protein kinase 1 (DAPK1) in chronic lymphocytic leukemia. *Cell* 2007 Jun 1;129(5):879-890.

Rawstron AC, Green MJ, Kuzmicki A, Kennedy B, Fenton JA, Evans PA, et al. Monoclonal B lymphocytes with the characteristics of "indolent" chronic lymphocytic leukemia are present in 3.5% of adults with normal blood counts. *Blood* 2002 Jul 15;100(2):635-639.

BIBLIOGRAFIA

- Raynal NJ, Momparler L, Charbonneau M, Momparler RL. Antileukemic activity of genistein, a major isoflavone present in soy products. *J.Nat.Prod.* 2008 Jan;71(1):3-7.
- Reddy KS. Chronic lymphocytic leukaemia profiled for prognosis using a fluorescence in situ hybridisation panel. *Br.J.Haematol.* 2006 Mar;132(6):705-722.
- Reed JC. Apoptosis-targeted therapies for cancer. *Cancer.Cell.* 2003 Jan;3(1):17-22.
- Reed JC, Kitada S, Kim Y, Byrd J. Modulating apoptosis pathways in low-grade B-cell malignancies using biological response modifiers. *Semin.Oncol.* 2002 Feb;29(1 Suppl 2):10-24.
- Reis-Sobreiro M, Gajate C, Mollinedo F. Involvement of mitochondria and recruitment of Fas/CD95 signaling in lipid rafts in resveratrol-mediated antimyeloma and antileukemia actions. *Oncogene* 2009 Sep 10;28(36):3221-3234.
- Rimokh R, Rouault JP, Wahbi K, Gadoux M, Lafage M, Archimbaud E, et al. A chromosome 12 coding region is juxtaposed to the MYC protooncogene locus in a t(8;12)(q24;q22) translocation in a case of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 1991 Jan;3(1):24-36.
- Ringshausen I, Oelsner M, Weick K, Bogner C, Peschel C, Decker T. Mechanisms of apoptosis-induction by rottlerin: therapeutic implications for B-CLL. *Leukemia* 2006 Mar;20(3):514-520.
- Ringshausen I, Schneller F, Bogner C, Hipp S, Duyster J, Peschel 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 Nov 15;100(10):3741-3748.
- Rodenburg RJ, Raats JM, Pruijn GJ, van Venrooij WJ. Cell death: a trigger of autoimmunity? *Bioessays* 2000 Jul;22(7):627-636.
- Rohrschneider LR, Fuller JF, Wolf I, Liu Y, Lucas DM. Structure, function, and biology of SHIP proteins. *Genes Dev.* 2000 Mar 1;14(5):505-520.
- Romano C, De Fanis U, Sellitto A, Chiurazzi F, Guastafierro S, Giunta R, et al. Induction of CD95 upregulation does not render chronic lymphocytic leukemia B-cells susceptible to CD95-mediated apoptosis. *Immunol.Lett.* 2005 Feb 15;97(1):131-139.
- Romashkova JA, Makarov SS. NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature* 1999 Sep 2;401(6748):86-90.
- Rommel C, Camps M, Ji H. PI3K delta and PI3K gamma: partners in crime in inflammation in rheumatoid arthritis and beyond? *Nat.Rev.Immunol.* 2007 Mar;7(3):191-201.
- Rozman C, Montserrat E. Chronic lymphocytic leukemia. *N.Engl.J.Med.* 1995 Oct 19;333(16):1052-1057.
- Ruboxistaurin: LY 333531. *Drugs R.D.* 2007;8(3):193-199.
- Ruiter GA, Zerp SF, Bartelink H, van Blitterswijk WJ, Verheij M. Anti-cancer alkyllysophospholipids inhibit the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/PKB survival pathway. *Anticancer Drugs.* 2003 Feb;14(2):167-73.
- Runge MH, Andreesen R, Pfeleiderer A, Munder PG. Destruction of human solid tumors by alkyllysophospholipids. *J.Natl.Cancer Inst.* 1980 Jun;64(6):1301-1306.

S

Sable CL, Filippa N, Filloux C, Hemmings BA, Van Obberghen E. Involvement of the pleckstrin homology domain in the insulin-stimulated activation of protein kinase B. *J.Biol.Chem.* 1998 Nov 6;273(45):29600-29606.

Sadhu C, Dick K, Tino WT, Staunton DE. Selective role of PI3K delta in neutrophil inflammatory responses. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 2003 Sep 5;308(4):764-769.

Salmena L, Carracedo A, Pandolfi PP. Tenets of PTEN tumor suppression. *Cell* 2008 May 2;133(3):403-414.

Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* 2004 Apr 23;304(5670):554.

Santidrian AF, Cosialls AM, Coll-Mulet L, Iglesias-Serret D, de Frias M, Gonzalez-Girones DM, et al. The potential anticancer agent PK11195 induces apoptosis irrespective of p53 and ATM status in chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica* 2007 Dec;92(12):1631-1638.

Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 2005 Feb 18;307(5712):1098-1101.

Sasaki T, Irie-Sasaki J, Jones RG, Oliveira-dos-Santos AJ, Stanford WL, Bolon B, et al. Function of PI3Kgamma in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration. *Science* 2000 Feb 11;287(5455):1040-1046.

Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 2000 Oct 12;407(6805):784-788.

Sawyer C, Sturge J, Bennett DC, O'Hare MJ, Allen WE, Bain J, et al. Regulation of breast cancer cell chemotaxis by the phosphoinositide 3-kinase p110delta. *Cancer Res.* 2003 Apr 1;63(7):1667-1675.

Saxena A, Viswanathan S, Moshynska O, Tandon P, Sankaran K, Sheridan DP. Mcl-1 and Bcl-2/Bax ratio are associated with treatment response but not with Rai stage in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Am.J.Hematol.* 2004 Jan;75(1):22-33.

Schaffner C, Stilgenbauer S, Rappold GA, Dohner H, Lichter P. Somatic ATM mutations indicate a pathogenic role of ATM in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999 Jul 15;94(2):748-753.

Scheid MP, Marignani PA, Woodgett JR. Multiple phosphoinositide 3-kinase-dependent steps in activation of protein kinase B. *Mol.Cell.Biol.* 2002 Sep;22(17):6247-6260.

Schimmer AD, Munk-Pedersen I, Minden MD, Reed JC. Bcl-2 and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia. *Curr.Treat.Options Oncol.* 2003 Jun;4(3):211-218.

Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 2002 Jun 15;30(12):e57.

Schroeder HW,Jr, Dighiero G. The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire. *Immunol.Today* 1994 Jun;15(6):288-294.

Seiler T, Dohner H, Stilgenbauer S. Risk stratification in chronic lymphocytic leukemia. *Semin.Oncol.* 2006 Apr;33(2):186-194.

Sellick GS, Catovsky D, Houlston RS. Familial chronic lymphocytic leukemia. *Semin.Oncol.* 2006 Apr;33(2):195-201.

BIBLIOGRAFIA

- Shaham S, Horvitz HR. Developing *Caenorhabditis elegans* neurons may contain both cell-death protective and killer activities. *Genes Dev.* 1996 Mar 1;10(5):578-591.
- She QB, Chandarlapaty S, Ye Q, Lobo J, Haskell KM, Leander KR, et al. Breast tumor cells with PI3K mutation or HER2 amplification are selectively addicted to Akt signaling. *PLoS One* 2008 Aug 26;3(8):e3065.
- Shi Y, Liu X, Han EK, Guan R, Shoemaker AR, Oleksijew A, et al. Optimal classes of chemotherapeutic agents sensitized by specific small-molecule inhibitors of akt in vitro and in vivo. *Neoplasia* 2005 Nov;7(11):992-1000.
- Shin I, Yakes FM, Rojo F, Shin NY, Bakin AV, Baselga J, et al. PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat.Med.* 2002 Oct;8(10):1145-1152.
- Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2000 Oct;1(1):31-39.
- Snowden RT, Sun XM, Dyer MJ, Cohen GM. Bisindolylmaleimide IX is a potent inducer of apoptosis in chronic lymphocytic leukaemic cells and activates cleavage of Mcl-1. *Leukemia* 2003 Oct;17(10):1981-1989.
- Sonnenburg ED, Gao T, Newton AC. The phosphoinositide-dependent kinase, PDK-1, phosphorylates conventional protein kinase C isozymes by a mechanism that is independent of phosphoinositide 3-kinase. *J.Biol.Chem.* 2001 Nov 30;276(48):45289-45297.
- Spinozzi F, Pagliacci MC, Migliorati G, Moraca R, Grignani F, Riccardi C, et al. The natural tyrosine kinase inhibitor genistein produces cell cycle arrest and apoptosis in Jurkat T-leukemia cells. *Leuk.Res.* 1994 Jun;18(6):431-439.
- Spurgers KB, Chari NS, Bohnenstiehl NL, McDonnell TJ. Molecular mediators of cell death in multistep carcinogenesis: a path to targeted therapy. *Cell Death Differ.* 2006 Aug;13(8):1360-1370.
- Staal SP, Hartley JW, Rowe WP. Isolation of transforming murine leukemia viruses from mice with a high incidence of spontaneous lymphoma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1977 Jul;74(7):3065-3067.
- Standaert ML, Bandyopadhyay G, Kanoh Y, Sajjan MP, Farese RV. Insulin and PIP3 activate PKC-zeta by mechanisms that are both dependent and independent of phosphorylation of activation loop (T410) and autophosphorylation (T560) sites. *Biochemistry* 2001 Jan 9;40(1):249-255.
- Stankovic T, Weber P, Stewart G, Bedenham T, Murray J, Byrd PJ, et al. Inactivation of ataxia telangiectasia mutated gene in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 1999 Jan 2;353(9146):26-29.
- Stevenson FK, Caligaris-Cappio F. Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood* 2004 Jun 15;103(12):4389-4395.
- Stilgenbauer S, Bullinger L, Lichter P, Dohner H, German CLL Study Group (GCLLSG). Chronic lymphocytic leukemia. Genetics of chronic lymphocytic leukemia: genomic aberrations and V(H) gene mutation status in pathogenesis and clinical course. *Leukemia* 2002 Jun;16(6):993-1007.
- Strasser A. The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat.Rev.Immunol.* 2005 Mar;5(3):189-200.
- Sturm I, Bosanquet AG, Hermann S, Guner D, Dorken B, Daniel PT. Mutation of p53 and consecutive selective drug resistance in B-CLL occurs as a consequence of prior DNA-damaging chemotherapy. *Cell Death Differ.* 2003 Apr;10(4):477-484.

Suire S, Coadwell J, Ferguson GJ, Davidson K, Hawkins P, Stephens L. p84, a new Gbetagamma-activated regulatory subunit of the type IB phosphoinositide 3-kinase p110gamma. *Curr.Biol.* 2005 Mar 29;15(6):566-570.

Sujobert P, Bardet V, Cornillet-Lefebvre P, Hayflick JS, Prie N, Verdier F, et al. Essential role for the p110delta isoform in phosphoinositide 3-kinase activation and cell proliferation in acute myeloid leukemia. *Blood* 2005 Aug 1;106(3):1063-1066.

Sulston JE. Post-embryonic development in the ventral cord of *Caenorhabditis elegans*. *Philos.Trans.R.Soc.Lond.B.Biol.Sci.* 1976 Aug 10;275(938):287-297.

Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, Takahashi K, Takio K, Takahashi R. A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol.Cell* 2001 Sep;8(3):613-621.

T

Tamura N, Hazeki K, Okazaki N, Kametani Y, Murakami H, Takaba Y, et al. Specific role of phosphoinositide 3-kinase p110alpha in the regulation of phagocytosis and pinocytosis in macrophages. *Biochem.J.* 2009 Sep 14;423(1):99-108.

Tazzari PL, Tabellini G, Ricci F, Papa V, Bortul R, Chiarini F, et al. Synergistic proapoptotic activity of recombinant TRAIL plus the Akt inhibitor Perifosine in acute myelogenous leukemia cells. *Cancer Res.* 2008 Nov 15;68(22):9394-9403.

Teitell MA. The TCL1 family of oncoproteins: co-activators of transformation. *Nat.Rev.Cancer.* 2005 Aug;5(8):640-648.

Tenzer A, Zingg D, Rocha S, Hemmings B, Fabbro D, Glanzmann C, et al. The phosphatidylinositide 3'-kinase/Akt survival pathway is a target for the anticancer and radiosensitizing agent PKC412, an inhibitor of protein kinase C. *Cancer Res.* 2001 Nov 15;61(22):8203-8210.

Tessier M, Woodgett JR. Serum and glucocorticoid-regulated protein kinases: variations on a theme. *J.Cell.Biochem.* 2006 Aug 15;98(6):1391-1407.

Thomas A, Pepper C, Hoy T, Bentley P. Bryostatin induces protein kinase C modulation, Mcl-1 up-regulation and phosphorylation of Bcl-2 resulting in cellular differentiation and resistance to drug-induced apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Leuk.Lymphoma* 2004 May;45(5):997-1008.

Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998 Aug 28;281(5381):1312-1316.

Ticchioni M, Essafi M, Jeandel PY, Davi F, Cassuto JP, Deckert M, et al. Homeostatic chemokines increase survival of B-chronic lymphocytic leukemia cells through inactivation of transcription factor FOXO3a. *Oncogene* 2007 Nov 1;26(50):7081-7091.

Tobin G, Skogsberg A, Thunberg U, Laurell A, Aleskog A, Merup M, et al. Mcl-1 gene promoter insertions do not correlate with disease outcome, stage or VH gene mutation status in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* 2005 May;19(5):871-873.

Totterman TH, Nilsson K, Sundstrom C. Phorbol ester-induced differentiation of chronic lymphocytic leukaemia cells. *Nature* 1980 Nov 13;288(5787):176-178.

Tran H, Brunet A, Griffith EC, Greenberg ME. The many forks in FOXO's road. *Sci.STKE* 2003 Mar 4;2003(172):RE5.

BIBLIOGRAFIA

Tsujimoto Y, Gorham J, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science* 1985 Sep 27;229(4720):1390-1393.

Tsujimoto Y, Yunis J, Onorato-Showe L, Erikson J, Nowell PC, Croce CM. Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of B-cell lymphomas and leukemias with the t(11;14) chromosome translocation. *Science* 1984 Jun 29;224(4656):1403-1406.

Vallat L, Magdelenat H, Merle-Beral H, Masdehors P, Potocki de Montalk G, Davi F, et al. The resistance of B-CLL cells to DNA damage-induced apoptosis defined by DNA microarrays. *Blood* 2003 Jun 1;101(11):4598-4606.

V

Van Loo G, Demol H, van Gurp M, Hoorelbeke B, Schotte P, Beyaert R, et al. A matrix-assisted laser desorption ionization post-source decay (MALDI-PSD) analysis of proteins released from isolated liver mitochondria treated with recombinant truncated Bid. *Cell Death Differ.* 2002 Mar;9(3):301-308.

Vanhaesebroeck B, Ali K, Bilancio A, Geering B, Foukas LC. Signalling by PI3K isoforms: insights from gene-targeted mice. *Trends Biochem.Sci.* 2005 Apr;30(4):194-204.

Vasudevan KM, Barbie DA, Davies MA, Rabinovsky R, McNear CJ, Kim JJ, et al. AKT-independent signaling downstream of oncogenic PIK3CA mutations in human cancer. *Cancer.Cell.* 2009 Jul 7;16(1):21-32.

Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 1988 Sep 29;335(6189):440-442.

Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, et al. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 2000 Jul 7;102(1):43-53.

Viglietto G, Motti ML, Bruni P, Melillo RM, D'Alessio A, Califano D, et al. Cytoplasmic relocalization and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nat.Med.* 2002 Oct;8(10):1136-1144.

Villunger A, Michalak EM, Coultas L, Mullauer F, Bock G, Ausserlechner MJ, et al. p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science* 2003 Nov 7;302(5647):1036-1038.

Vink SR, van Blitterswijk WJ, Schellens JH, Verheij M. Rationale and clinical application of alkylphospholipid analogues in combination with radiotherapy. *Cancer Treat.Rev.* 2007 Apr;33(2):191-202.

Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000 Nov 16;408(6810):307-310.

Voigt P, Dorner MB, Schaefer M. Characterization of p87PIKAP, a novel regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase gamma that is highly expressed in heart and interacts with PDE3B. *J.Biol.Chem.* 2006 Apr 14;281(15):9977-9986.

Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat.Rev.Cancer.* 2002 Aug;2(8):594-604.

W

Wadhwa PD, Morrison VA. Infectious complications of chronic lymphocytic leukemia. *Semin.Oncol.* 2006 Apr;33(2):240-249.

Walensky LD. BCL-2 in the crosshairs: tipping the balance of life and death. *Cell Death Differ.* 2006 Aug;13(8):1339-1350.

Wang TY, Samples DM, Dabdoub R, Prakash O. c-myc and K-ras-2 oncogenes in B-cell chronic lymphocytic leukemia with del(12)(p13). *Cancer Genet.Cytogenet.* 1991 Jan;51(1):125-130.

Wattel E, Preudhomme C, Hecquet B, Vanrumbeke M, Quesnel B, Dervite I, et al. P53 Mutations are Associated with Resistance to Chemotherapy and Short Survival in Hematologic Malignancies. *Blood* 1994 Nov 1;84(9):3148-3157.

Way KJ, Chou E, King GL. Identification of PKC-isoform-specific biological actions using pharmacological approaches. *Trends Pharmacol.Sci.* 2000 May;21(5):181-187.

Webster MK, Goya L, Ge Y, Maiyar AC, Firestone GL. Characterization of sgk, a novel member of the serine/threonine protein kinase gene family which is transcriptionally induced by glucocorticoids and serum. *Mol.Cell.Biol.* 1993 Apr;13(4):2031-2040.

Weinberg RA. *The Biology of Cancer.* : Book Garland Science; 2007.

Weinstein IB. Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heal of cancer. *Science* 2002 Jul 5;297(5578):63-64.

Wickremasinghe RG, Ganeshaguru K, Jones DT, Lindsay C, Spanswick VJ, Hartley JA, et al. Autologous plasma activates Akt/protein kinase B and enhances basal survival and resistance to DNA damage-induced apoptosis in B-chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br.J.Haematol.* 2001 Sep;114(3):608-615.

Wierda WG, O'Brien SM. Initial therapy for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Semin.Oncol.* 2006 Apr;33(2):202-209.

Woodgett JR. Recent advances in the protein kinase B signaling pathway. *Curr.Opin.Cell Biol.* 2005 Apr;17(2):150-157.

Wullschlegler S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 2006 Feb 10;124(3):471-484.

Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int.Rev.Cytol.* 1980;68:251-306.

X

Xin M, Deng X. Nicotine inactivation of the proapoptotic function of Bax through phosphorylation. *J.Biol.Chem.* 2005 Mar 18;280(11):10781-10789.

Y

Yang L, Dan HC, Sun M, Liu Q, Sun XM, Feldman RI, et al. Akt/protein kinase B signaling inhibitor-2, a selective small molecule inhibitor of Akt signaling with antitumor activity in cancer cells overexpressing Akt. *Cancer Res.* 2004 Jul 1;64(13):4394-4399.

Yang WL, Wang J, Chan CH, Lee SW, Campos AD, Lamothe B, et al. The E3 ligase TRAF6 regulates Akt ubiquitination and activation. *Science* 2009 Aug 28;325(5944):1134-1138.

Yip SC, El-Sibai M, Hill KM, Wu H, Fu Z, Condeelis JS, et al. Over-expression of the p110beta but not p110alpha isoform of PI 3-kinase inhibits motility in breast cancer cells. *Cell Motil.Cytoskeleton* 2004 Nov;59(3):180-188.

BIBLIOGRAFIA

Yoshida H, Kong YY, Yoshida R, Elia AJ, Hakem A, Hakem R, et al. Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. *Cell* 1998 Sep 18;94(6):739-750.

You H, Pellegrini M, Tsuchihara K, Yamamoto K, Hacker G, Erlacher M, et al. FOXO3a-dependent regulation of Puma in response to cytokine/growth factor withdrawal. *J.Exp.Med.* 2006 Jul 10;203(7):1657-1663.

Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2008 Jan;9(1):47-59.

Yuille MR, Matutes E, Marossy A, Hilditch B, Catovsky D, Houlston RS. Familial chronic lymphocytic leukaemia: a survey and review of published studies. *Br.J.Haematol.* 2000 Jun;109(4):794-799.

Z

Zapata JM, Krajewska M, Morse HC,3rd, Choi Y, Reed JC. TNF receptor-associated factor (TRAF) domain and Bcl-2 cooperate to induce small B cell lymphoma/chronic lymphocytic leukemia in transgenic mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2004 Nov 23;101(47):16600-16605.

Zenz T, Dohner K, Denzel T, Dohner H, Stilgenbauer S, Bullinger L. Chronic lymphocytic leukaemia and acute myeloid leukaemia are not associated with AKT1 pleckstrin homology domain (E17K) mutations. *Br.J.Haematol.* 2008 May;141(5):742-743.

Zhang H, Zha X, Tan Y, Hornbeck PV, Mastrangelo AJ, Alessi DR, et al. Phosphoprotein analysis using antibodies broadly reactive against phosphorylated motifs. *J.Biol.Chem.* 2002 Oct 18;277(42):39379-39387.

Zhang TT, Okkenhaug K, Nashed BF, Puri KD, Knight ZA, Shokat KM, et al. Genetic or pharmaceutical blockade of p110delta phosphoinositide 3-kinase enhances IgE production. *J.Allergy Clin.Immunol.* 2008 Oct;122(4):811-819.e2.

Zhang Y, Weber-Matthiesen K, Siebert R, Matthiesen P, Schlegelberger B. Frequent deletions of 6q23-24 in B-cell non-Hodgkin's lymphomas detected by fluorescence in situ hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 1997 Apr;18(4):310-313.

Zhou BP, Liao Y, Xia W, Spohn B, Lee MH, Hung MC. Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat.Cell Biol.* 2001a Mar;3(3):245-252.

Zhou BP, Liao Y, Xia W, Zou Y, Spohn B, Hung MC. HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nat.Cell Biol.* 2001b Nov;3(11):973-982.

Zhu N, Gu L, Li F, Zhou M. Inhibition of the Akt/survivin pathway synergizes the antileukemia effect of nutlin-3 in acute lymphoblastic leukemia cells. *Mol.Cancer.Ther.* 2008 May;7(5):1101-1109.

Zhuang J, Hawkins SF, Glenn MA, Lin K, Johnson GG, Carter A, et al. Akt is activated in chronic-lymphocytic-leukemia cells and delivers a pro-survival signal: therapeutic potential of Akt inhibition. *Haematologica* 2009 Aug 27.

Ziegler WH, Parekh DB, Le Good JA, Whelan RD, Kelly JJ, Frech M, et al. Rapamycin-sensitive phosphorylation of PKC on a carboxy-terminal site by an atypical PKC complex. *Curr.Biol.* 1999 May 20;9(10):522-529.

PUBLICACIONES

PUBLICACIONS

Les publicacions derivades d'aquesta tesi són les següents:

Montserrat Barragán*, Mercè de Frias*, Daniel Iglesias-Serret, Clara Campàs, Esther Castaño, Antonio F. Santidrián, Llorenç Coll-Mulet, Ana M. Cosialls, Alicia Domingo, Gabriel Pons, and Joan Gil.

Regulation of Akt/PKB by phosphatidylinositol 3-kinase dependent and -independent pathways in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells: role of protein kinase C β .

Journal of Leukocyte Biology, 2006 Dec;80(6):1473-9.

* These authors contributed equally to this work.

Mercè de Frias, Daniel Iglesias-Serret, Ana M. Cosialls, Llorenç Coll-Mulet, Antonio F. Santidrián, Diana M. González-Gironès, Esmeralda de la Banda, Gabriel Pons, and Joan Gil.

Akt inhibitors induce apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells.

Haematologica, 2009 Dec;94(12):1698-707.

Faustino Mollinedo, Janis de la Iglesia-Vicente, Consuelo Gajate, Ander Estella-Hermoso de Mendoza, Janny A. Villa-Pulgarin, Mercè de Frias, Gaël Roué, Joan Gil, Dolors Colomer, Miguel A. Campanero, and Maria J. Blanco-Prieto.

In vitro and in vivo selective antitumor activity of edelfosine against mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia involving lipid rafts

Clinal Cancer Research, acceptat.

Mercè de Frias, Daniel Iglesias-Serret, Ana M. Cosialls, Diana M. González-Gironès, Alba Pérez-Perarnau, Camila Rubio-Patiño, Thomas Rückle, Montserrat Camps, Alberto Fernández de Sevilla, Esmeralda de la Banda, Gabriel Pons and Joan Gil.

Isoform-selective phosphoinositide 3-kinase (PI3K) inhibitors induce apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells.

British Journal of Haematology, acceptat.

Regulation of Akt/PKB by phosphatidylinositol 3-kinase-dependent and -independent pathways in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells: role of protein kinase C β

Montserrat Barragán,^{*1} Mercè de Frias,^{*1} Daniel Iglesias-Serret,^{*} Clara Campàs,^{*} Esther Castaño,^{*} Antonio F. Santidrián,^{*} Llorenç Coll-Mulet,^{*} Ana M. Cosials,^{*} Alicia Domingo,[†] Gabriel Pons,^{*} and Joan Gil^{*,2}

^{*}Unitat de Bioquímica, Departament de Ciències Fisiològiques II, IDIBELL-Universitat de Barcelona, Campus de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain; and [†]Servei d'Hematologia, IDIBELL-Hospital Universitari de Bellvitge, Campus de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

Abstract: Apoptosis of B cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells is regulated by the PI-3K-Akt pathway. In the present work, we have analyzed the mechanisms of Akt phosphorylation in B-CLL cells. Freshly isolated cells present basal Akt phosphorylation, which is PI-3K-dependent, as incubation with the PI-3K inhibitor LY294002 decreased Ser-473 and Thr-308 phosphorylation in most samples analyzed (seven out of 10). In three out of 10 cases, inhibition of protein kinase C (PKC) inhibited basal Akt phosphorylation. Stromal cell-derived factor-1 α , IL-4, and B cell receptor activation induced PI-3K-dependent Akt phosphorylation. PMA induced the phosphorylation of Akt at Ser-473 and Thr-308 and the phosphorylation of Akt substrates, independently of PI-3K in B-CLL cells. In contrast, PKC-mediated phosphorylation of Akt was PI-3K-dependent in normal B cells. Finally, a specific inhibitor of PKC β blocked the phosphorylation and activation of Akt by PMA in B-CLL cells. Taken together, these results suggest a model in which Akt could be activated by two different pathways (PI-3K and PKC β) in B-CLL cells. *J. Leukoc. Biol.* 80: 1473–1479; 2006.

Key Words: apoptosis · signal transduction

INTRODUCTION

Apoptosis of B cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells is regulated by multiple signal transduction pathways (reviewed in ref. [1]). Several reports have described the role of PI-3K in B-CLL cell survival [2–10]. Thus, it has recently been reported that inhibition of constitutively activated PI-3K induces apoptosis in B-CLL cells [4, 5]. Moreover, PI-3K inhibition increases the sensitivity of B-CLL cells to fludarabine, dexamethasone, and chlorambucil *ex vivo* [4, 6] and blocks the survival effect of engagement of the antigen receptor, phorbol esters, IL-4, albumin, and lysophosphatidic acid in B-CLL cells [2, 4, 8–10].

The most characterized target of PI-3K involved in cell survival is Akt, also known as protein kinase B (PKB), which is a point of convergence of several signaling pathways involved in cell proliferation, survival, differentiation, and metabolism in most cell types including B lymphocytes [11–13]. It is important that deregulation of Akt has been implicated in the development of human cancer, and this kinase could be a target for cancer therapy [14–16]. Akt resides in the cytosol in a low-activity conformation, and it is activated through recruitment to cell membranes by PI-3K lipid products and phosphorylation. Akt phosphorylation occurs at the catalytic domain (Thr-308) by 3'-phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK-1) [17]. The mechanism leading to phosphorylation of Ser-473 is unclear [18, 19], and candidate Ser-473 kinases include MAPK-activated protein kinase 2 (MK2) [20, 21], DNA-dependent protein kinase [22], PKC β [23], and Rictor-mammalian target of rapamycin (mTOR) complex [24]. Active Akt phosphorylates and inactivates multiple proteins involved in the control of apoptosis, including Bad, caspase-9, glycogen synthase kinase-3 (GSK-3), and the Forkhead family of transcription factors [11, 13, 14].

Although several recent reports propose a role for Akt in B-CLL cell survival [4, 6–8], the regulation of Akt and its role in the survival of B-CLL cells are poorly characterized. First, it is controversial whether B-CLL cells present basal Akt activity [4–8]. Second, it is not clear whether the phosphorylation of Akt is dependent on PI-3K. Thus, inhibition of PI-3K decreases Akt phosphorylation induced by plasma [3], anti-IgM [2], IL-4 [4], or albumin [6]; however, it does not affect PKC-induced Akt phosphorylation [4]. Third, although phorbol esters and survival signals induce phosphorylation of Akt in Ser-473 [4], the effect on the phosphorylation of Thr-308, necessary for full activation of Akt, has not been analyzed. Here, we examine the signal transduction pathways involved in the phosphorylation and activation of Akt in B-CLL cells.

¹ These authors contributed equally to this work.

² Correspondence: Departament de Ciències Fisiològiques II, IDIBELL-Universitat de Barcelona, Campus de Bellvitge, Pavelló de Govern, 4^a planta, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona E-08907, Spain. E-mail: jgil@ub.edu.

Received January 20, 2006; revised May 12, 2006; accepted July 3, 2006; doi: 10.1189/jlb.0106041.

MATERIALS AND METHODS

Cytokines and chemical reagents

PMA, staurosporine (Ssp), and PMSF were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Recombinant human IL-4 and stromal cell-derived factor-1 α (SDF-1 α) were purchased from Immunotools (Friesoythe, Germany). Bisindolylmaleimide I (Bis I), SB203580, PD98059 and LY294002 were purchased from Calbiochem-Novabiochem (San Diego, CA). LY333531 and SH-5 were purchased from Alexis Biochemicals (Lausen, Switzerland). Goat F(ab')₂ anti-human IgM was purchased from Southern Biotechnology Associates (Birmingham, AL), and Triciribine was purchased from BIAffin GmbH and Co KG (Kassel, Germany).

B-CLL patients and cell isolation

B-CLL was diagnosed according to standard clinical and laboratory criteria. Cells were obtained from the Hospital de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat (Spain). Written informed consent was obtained from all patients. Mononuclear cells from peripheral blood samples were isolated by centrifugation on a Ficoll/Hypaque (Seromed, Berlin, Germany) gradient and cryopreserved in liquid nitrogen in the presence of 10% DMSO.

Normal B and T lymphocyte isolation

Four whole blood samples from healthy donors were obtained from the Hospital de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat. B lymphocytes or T lymphocytes were isolated using RosetteSepTM human B cell or RosetteSepTM human T cell enrichment cocktails (StemCell Technologies, Vancouver, Canada). Briefly, 1 ml RosetteSepTM was added to 20 ml whole blood. The mixed solution was incubated at room temperature for 20 min. Then, the sample was diluted with an equal volume of PBS plus 2% heat-inactivated FBS (Gibco-Invitrogen, Frederick, MD), layered on the top of Ficoll/Hypaque medium, and centrifuged at 1200 *g* for 20 min. B or T cells were removed from the density medium/plasma interface and washed twice with PBS plus 2% FBS before culture.

Cell culture

Cells were cultured at a concentration of 5×10^6 cells/ml in RPMI-1640 culture medium supplemented with 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, and 0.1 mg/ml streptomycin (Biological Industries, Kibbutz, Beit Haemek, Israel) and 10% heat-inactivated FBS at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% carbon dioxide.

Flow cytometry analysis of cell viability

Cell viability was determined simultaneously by double-staining with FITC-conjugated annexin V (Bender MedSystem, Vienna, Austria) and propidium iodide (PI), as described previously [4]. Briefly, 2×10^5 B-CLL cells were washed in PBS and resuspended in 100 μ L annexin V binding buffer (10 mM HEPES, pH 7.4, 2.5 mM CaCl₂, 140 mM NaCl) containing 1 μ L FITC annexin V. After 15 min of incubation in the dark at room temperature, cells were diluted with 100 μ L annexin V binding buffer containing 1 μ g/ml PI and analyzed with a FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA). Data analysis was performed with CellQuest software (Becton Dickinson). Cell viability was measured as the percentage of annexin V- and PI-negative cells.

Western blot analysis of protein phosphorylation

Lymphocytes from B-CLL patients were incubated at a density of 5×10^6 cells/ml for the indicated period of time, washed in ice-cold PBS, resuspended in lysis buffer (Tris-buffered saline containing 1% Triton X-100, 1 mM sodium orthovanadate, 50 mM sodium fluoride, 5 mM EDTA, 40 mM β -glycerophosphate, 100 mM NaCl, 1 μ g/ml pepstatin, 1 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml aprotinin, 1 mM benzamide, and 1 mM PMSF), and incubated on ice for 15 min. After 1 min of vortexing, lysates were spun at 16,000 *g* for 15 min at 4°C, supernatants were collected, and protein concentration was determined using the Micro bicinchoninic acid protein assay reagent kit (Pierce, Rockford, IL). For detection of phosphorylated forms of Akt, 50 μ g each protein lysate was separated on 12% SDS-polyacrylamide gels, transferred to Immobilon-P membranes (Millipore, Bedford, MA), and analyzed by Western blotting. After binding with HRP-conjugated secondary antibodies, blots were visualized with

the ECL detection system (Amersham, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). Antibodies against phospho-Akt (Ser-473), phospho-ERK (Thr-202/Tyr-204), phospho-FoxO3 (member of the Forkhead box O family), and phospho-substrates of Akt were purchased from Cell Signaling Technologies (Beverly, MA). The antibody against phospho-Akt (Thr-308) was purchased from Affinity (Golden, CO), and the antibody against phospho-GSK3 α/β was from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). As a confirmation of equal loading and transfer proteins, blots were stripped and reprobed with antibodies against total Akt (Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA), ERK (Upstate Biotechnology), or α -tubulin (Sigma Chemical Co.).

Statistical analysis

Data were analyzed using the SPSS (Chicago, IL) 11.5 software package. Results are shown as mean \pm SEM of values obtained in independent experiments. The Student's *t*-test was used to compare the differences between samples.

RESULTS

Role of PI-3K and PKC in basal Akt phosphorylation

First, we analyzed the basal phosphorylation state of Akt in freshly isolated and cryopreserved B-CLL cells from 12 different patients. Comparison of freshly isolated with cryopreserved cells showed that phosphorylation of Akt at Ser-473 and Thr-308 was lost after isolation and one cryopreservation/thawing cycle (Fig. 1A). This basal Akt phosphorylation present in fresh cells is PI-3K-dependent, as incubation with the PI-3K inhibitor LY294002 decreased Ser-473 and Thr-308 phosphorylation in most samples analyzed (seven out of 10; Fig. 1B, Patients 5–7). In addition, in three out of 10 samples, basal Akt phosphorylation was PKC-dependent, as incubation with the

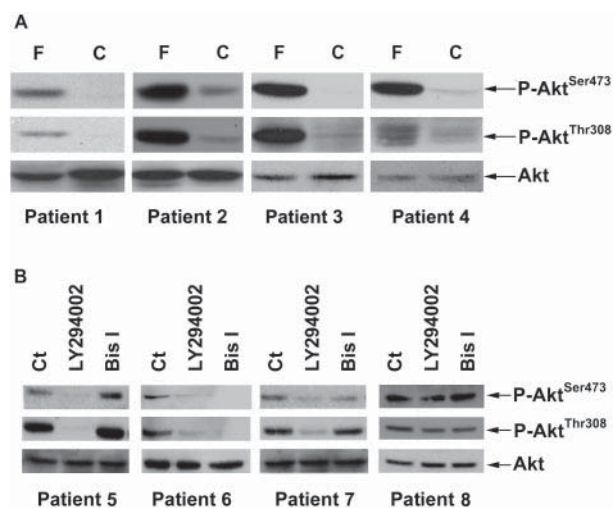


Fig. 1. B-CLL cells have constitutive Akt activity, which is blocked by PI-3K or PKC inhibition. (A) Akt is phosphorylated (P-Akt) at Ser-473 and Thr-308 in freshly isolated, primary B-CLL lymphocytes. Freshly isolated B-CLL cells were lysed 1 h after separation from peripheral blood (freshly isolated, F) or 1 h after thawing (cryopreserved, C). Representative results with fresh or cryopreserved samples derived from four patients from 12 analyzed are shown. (B) Fresh B-CLL cells were incubated for 1 h in the presence of 20 μ M LY294002, 5 μ M Bis I, or in medium alone (Ct). Representative results with fresh samples derived from four patients out of 10 analyzed are shown. Whole protein lysates from different samples were analyzed by immunoblotting with specific antibodies as indicated.

PKC inhibitor Bis I decreased Ser-473 and Thr-308 (Fig. 1B, Patient 6) or Ser-473 Akt phosphorylation (Fig. 1B, Patient 7). Finally, in some samples (three out of 10), basal Akt phosphorylation was not affected by PI-3K or PKC inhibitors (Fig. 1B, Patient 8).

Two candidates to maintain basal Akt phosphorylation in B-CLL cells are SDF-1 α and IL-4, which are synthesized by nurse-like cells and T lymphocytes, respectively, and induce survival of B-CLL cells [4, 25]. SDF-1 α induced Akt phosphorylation at Ser-473 and Thr-308 (Fig. 2A). This phosphorylation was inhibited by LY294002 but not by Bis I (n=3), indicating that SDF-1 α induced Akt phosphorylation by a PI-3K-dependent mechanism. Similar results were obtained with IL-4 and CD40 ligand (data not shown). Furthermore, activation of BCR induced Akt phosphorylation by a PKC-independent and PI-3K-dependent mechanism. In contrast, PMA-induced Akt phosphorylation was not inhibited by LY294002 (Fig. 2A).

To examine whether this PMA-induced, PI-3K-independent phosphorylation of Ser-473 was specific to B-CLL cells, we analyzed the effect of PMA on Akt phosphorylation in several cell lines and in normal B and T lymphocytes. PMA did not induce Ser-473 phosphorylation in any of the cell lines analyzed, including EHEB (human B cell chronic lymphocytic leukemia), JVM-2 (human B-prolymphocytic leukemia), BAF-3 (mouse pro B cells), HeLa (human cervix carcinoma), and Swiss 3T3 (mouse Swiss albino embryo fibroblasts) (data not shown). Similarly to B-CLL cells, treatment of human B and T lymphocytes from normal donors with PMA induced the phosphorylation of Ser-473 and Thr-308, and this phosphorylation was inhibited by Bis I. In contrast to B-CLL and normal T cells, PMA-induced phosphorylation of Akt was inhibited by LY294002 in normal B cells (n=2; Fig. 2B).

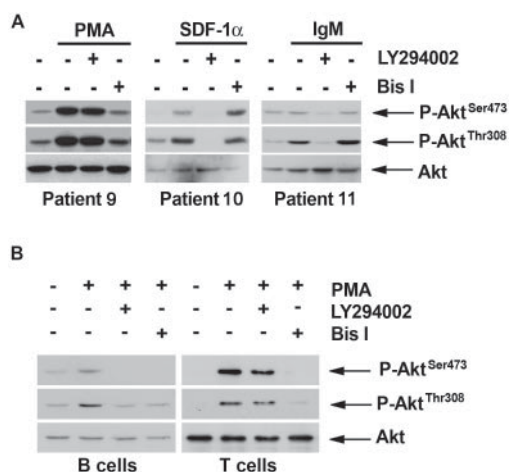


Fig. 2. PI-3K-dependent and PI-3K-independent Akt phosphorylation in B-CLL and normal B cells. (A) Cryopreserved B-CLL cells were preincubated for 1 h with 20 μ M LY294002 or 5 μ M Bis I and incubated with 10 nM PMA, 50 ng/ml SDF-1 α , or 10 μ g/ml goat F(ab')₂ anti-human IgM for an additional 20 min (n=3). (B) Normal B and T cells were preincubated in the presence of 20 μ M LY294002 or 5 μ M Bis I for 1 h prior to stimulation with 10 nM PMA for an additional 20 min. Whole protein lysates from different samples were analyzed by immunoblotting with specific antibodies as indicated.

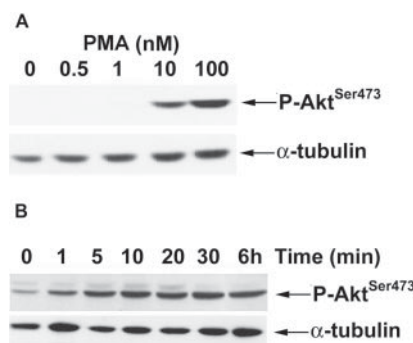


Fig. 3. PMA induces Akt phosphorylation in a dose- and time-dependent manner. Cryopreserved B-CLL cells were incubated (A) with increasing concentrations of PMA for 20 min or (B) with 10 nM PMA for the indicated periods of time. At the end of each time, cells were harvested and lysed, and Akt phosphorylation in Ser-473 was analyzed by Western blot as described in Materials and Methods. Results from one representative patient sample are shown.

PMA-induced Akt phosphorylation activates Akt in B-CLL cells

To further characterize Akt phosphorylation by PMA, dose-response and time-course experiments were performed in B-CLL cells. PMA induced Ser-473 phosphorylation at 10 nM in all cases analyzed (n=4; Fig. 3A). Incubation of cells with PMA induced Ser-473 phosphorylation after 1 min, with a peak at 10–30 min, which was maintained for at least 6 h in all cases analyzed (n=5; Fig. 3B).

We next analyzed whether PMA treatment increases Akt activity in B-CLL cells using phospho-specific antibodies generated against the Akt substrate consensus sequence [26]. As expected, some Akt substrates were phosphorylated in basal conditions from freshly isolated cells, and LY294002 and Bis I treatment decreased this phosphorylation (Fig. 4A). It is important that treatment with PMA increased the phosphorylation of several Akt substrates. The most prominent phosphorylated Akt substrates had an apparent molecular mass of ~30, 52, 66, 80, 95, and 120 kDa. PMA-induced phosphorylation of these proteins was not inhibited by LY294002 (only phosphorylation of 30-kDa protein was slightly decreased) and completely blocked by Bis I. The 30-kDa protein has been identified previously as S6 ribosomal protein [26]. Using specific antibodies against known Akt substrates, we found that the 52-kDa and the 95-kDa proteins correspond to GSK3 β and FoxO3, respectively (Fig. 4B).

Effect of protein kinase inhibitors on PKC-induced Akt phosphorylation

To analyze the signal transduction pathways involved in PMA-induced Akt phosphorylation, we used selective protein kinase inhibitors (Fig. 5). As previously shown, the effect of PMA on Akt phosphorylation was blocked completely by Bis I, a selective inhibitor of classical and novel isoforms of PKC. The p38-MK2 and MEK-ERK pathways are activated downstream of PKC. However, inhibition of p38 MAPK and MEK by SB203580 and PD98059, respectively, did not affect Ser-473 phosphorylation. Furthermore, our results show that PMA-

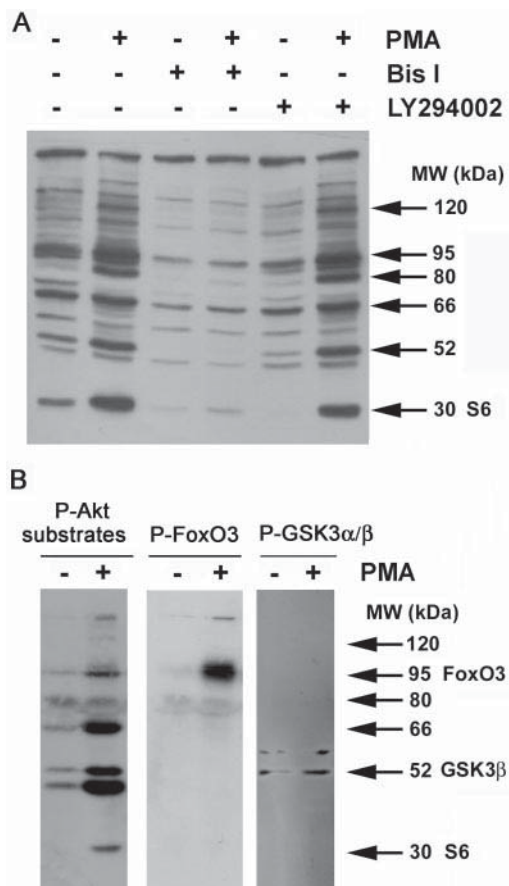


Fig. 4. PMA induces Akt activation in B-CLL cells. (A) Cryopreserved B-CLL cells from a representative patient out of four analyzed were incubated with 20 μ M LY294002 or 5 μ M Bis I for 1 h before addition of 10 nM PMA to the culture for an additional 20 min. Cells were lysed, and whole extracts were analyzed by Western blot with a specific antibody against phosphorylated Akt substrates, as described in Materials and Methods. (B) Cryopreserved B-CLL cells were incubated with 10 nM PMA for 20 min. Whole protein lysates were analyzed by immunoblotting with phospho-Akt substrates, phospho-FoxO3, and phospho-GSK3 α/β . Results from one representative patient sample from three analyzed are shown.

induced Ser-473 phosphorylation was blocked completely by 50 nM Ssp, indicating that a Ssp-sensitive kinase is involved in this phosphorylation in B-CLL cells. Neither SH-5, which prevents phosphatidylinositol-3-phosphate binding to pleckstrin homolog (PH) domain, nor triciribine, an inhibitor of Akt phosphorylation, inhibited PMA-induced Akt phosphorylation (Fig. 5B). Finally, neither mTOR nor calmodulin-dependent pathways play a role in PKC-induced Ser-473 phosphorylation in B-CLL cells, as rapamycin (an inhibitor of mTOR) and W13 (an inhibitor of calmodulin-dependent proteins) did not affect PMA-induced Akt phosphorylation (data not shown).

PKC β induces Akt phosphorylation independently of PI-3K in B-CLL cells

While we were performing the present study, it was reported that classic PKC isoforms, particularly, PKC β II, can regulate Akt activity by directly phosphorylating the critical residue Ser-473 in vitro and in Fc ϵ RI-stimulated mast cells [23]. Thus, we examined whether Akt phosphorylation depends on the

activity of this PKC isoform. As shown in **Figure 6A**, Akt phosphorylation on Ser-473 and Thr-308 was inhibited by the PKC β inhibitor LY333531 [27] in a dose-dependent manner. Time-course experiments showed that inhibition of PKC β blocked Akt phosphorylation at Ser-473 and Thr-308 at all times analyzed (Fig. 6B). In contrast, PKC β was not required for Ser-473 phosphorylation in B-CLL cells stimulated with IgM or SDF-1 α (Fig. 6C). Basal and PMA-induced phosphorylation of Akt substrates was inhibited by LY333531 (Fig. 6D), indicating that a PKC β -dependent pathway activates Akt in B-CLL cells. Similarly to B-CLL cells, treatment of human B and T lymphocytes from normal donors with PMA induced the phosphorylation of Ser-473 and Thr-308, and this phosphorylation was inhibited by LY333531 (Fig. 6E). It is surprisingly that 1 μ M LY333531, a dose that inhibited PMA-induced Akt phosphorylation, did not affect viability of B-CLL cells from six different patients (control, 60% \pm 11%; PMA, 73% \pm 8%; LY333531, 59% \pm 18%; PMA+LY333531, 74% \pm 11%). Finally, we analyzed the effect of the combination of LY294002 and PKC inhibitors on the viability of B-CLL cells. Bis I and LY294002 had an additive effect, but LY333531 did not increase the apoptotic effect of LY294002 (**Fig. 7**).

DISCUSSION

Our results show that PKC β induces the phosphorylation and activation of Akt independently of PI-3K in B-CLL cells. Activation of PKC is sufficient to induce Akt phosphorylation in some cell types [4, 23, 28–35]. Thus, we reported that phorbol esters induce Akt phosphorylation at Ser-473, independently of PI-3K [4]. In addition, it has been reported that incubation of human platelets with phorbol esters induces Akt phosphorylation [32, 33] and that phorbol esters induce Akt phosphorylation in murine T lymphocytes and the myeloid cell line FDC-P1 [34, 35].

PKC-mediated phosphorylation of Akt is independent of PI-3K in B-CLL cells and in normal T cells, but it is surprising

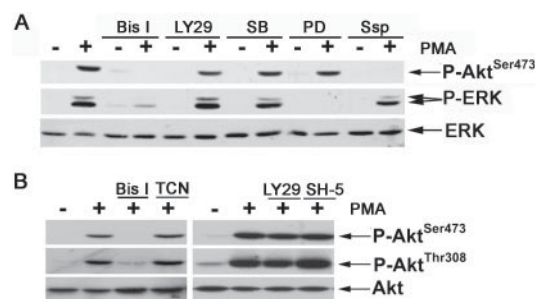


Fig. 5. Effect of protein kinase inhibitors on PMA-induced Akt phosphorylation. (A) Cryopreserved B-CLL cells were preincubated in the presence of 5 μ M Bis I, 20 μ M LY294002 (LY29), 10 μ M SB203580 (SB), 20 μ M PD98059 (PD), and 50 nM Ssp for 1 h prior to stimulation with 10 nM PMA. After 20 min of stimulation, the cells were lysed, and Akt and ERK phosphorylation was analyzed. Results from one representative patient sample from four analyzed are shown. (B) Cryopreserved B-CLL cells were preincubated in the presence of 5 μ M Bis I, 1 μ M Triciribine (TCN), 20 μ M LY294002, and 10 μ M SH-5 for 1 h prior to stimulation with 10 nM PMA (n=3).

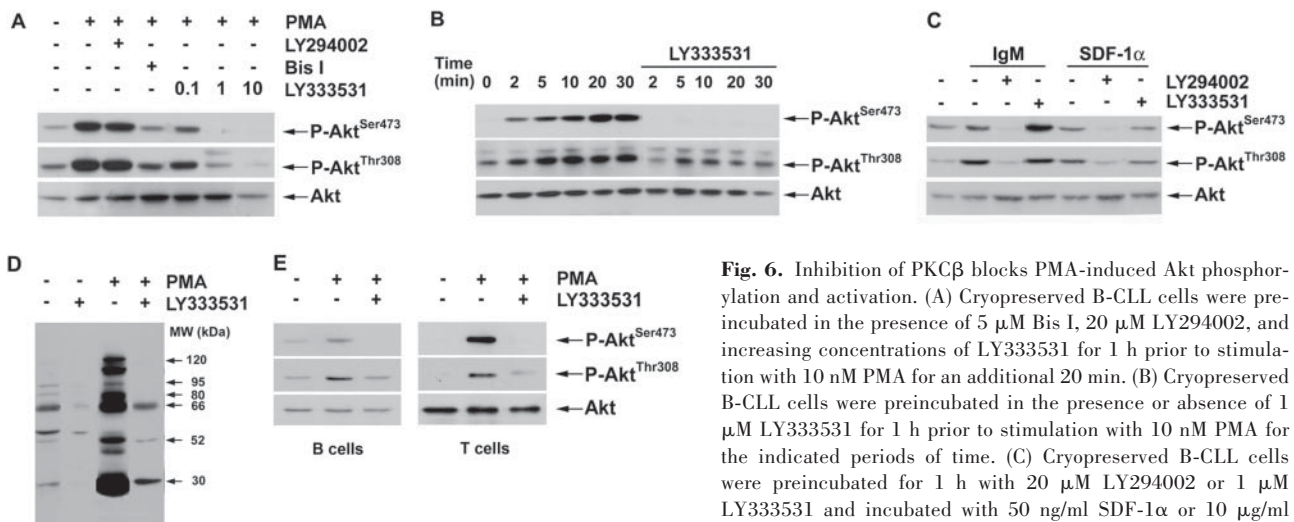


Fig. 6. Inhibition of PKC β blocks PMA-induced Akt phosphorylation and activation. (A) Cryopreserved B-CLL cells were preincubated in the presence of 5 μ M Bis I, 20 μ M LY294002, and increasing concentrations of LY333531 for 1 h prior to stimulation with 10 nM PMA for an additional 20 min. (B) Cryopreserved B-CLL cells were preincubated in the presence or absence of 1 μ M LY333531 for 1 h prior to stimulation with 10 nM PMA for the indicated periods of time. (C) Cryopreserved B-CLL cells were preincubated for 1 h with 20 μ M LY294002 or 1 μ M LY333531 and incubated with 50 ng/ml SDF-1 α or 10 μ g/ml goat F(ab')₂ anti-human IgM for an additional 20 min. (D)

Inhibition of PKC β blocks PMA-induced phosphorylation of Akt substrates. B-CLL cells were preincubated in the presence of 1 μ M LY333531 for 1 h prior to stimulation with 10 nM PMA for an additional 20 min. Results from one representative patient sample from three analyzed are shown. (E) Normal B and T cells were preincubated in the presence of 1 μ M LY333531 for 1 h prior to stimulation with 10 nM PMA for an additional 20 min. Results from one representative sample from two analyzed are shown.

that this phosphorylation depends on PI-3K in normal B lymphocytes. The reason for this difference is unknown. One possibility is that B-CLL cells have lost this dependency during transformation. A second possibility is that this is a characteristic of the normal B cell subpopulation from which B-CLL cells develop. In fact, B-CLL cells express CD5 and ZAP-70, two proteins that are expressed in normal T cells but not in normal B cells [36]. The understanding of this difference between B-CLL cells and normal B lymphocytes could be exploited in the future for a more targeted and selective therapy.

Recently, it has been reported that classic PKC isoforms, particularly PKC β II, regulate Akt activity by directly phosphorylating the critical residue Ser-473 in vitro and in Fc ϵ RI-stimulated mast cells [23]. Thus, PKC β is a candidate to directly phosphorylate Akt at Ser-473 in B-CLL cells. Whether or not PKC β is involved in the phosphorylation of Akt in platelets and myeloid cells is unknown. Our results indicate

that PMA-induced Akt phosphorylation in normal human B and T lymphocytes is dependent on PKC β . B-CLL cells express high levels of PKC β protein [37], and this raises the possibility that PKC β could be deregulated in these leukemia cells. Furthermore, it is possible that PKC β plays a role in the activation of Akt in other leukemias.

In vitro studies demonstrate that PKC β directly phosphorylates Akt at Ser-473 without affecting the phosphorylation status of the Thr-308 residue [23]. However, in B-CLL cells, inhibition of PKC β decreases Ser-473 and Thr-308 phosphorylation. As Thr-308 phosphorylation is not inhibited by LY294002 in response to PMA, these results suggest that a protein kinase acting downstream of PKC β mediates the phosphorylation of Thr-308 independently of PI-3K in B-CLL cells. Alternatively, PKC β could induce the activation of PDK-1 independently of PI-3K, as reported for the tyrosine kinase rearranged in transformation/papillary thyroid carcinomas [38]. Finally, the decrease in Thr-308 phosphorylation induced by LY333531 is also consistent with the model, in which Ser-473 phosphorylation precedes the phosphorylation of Thr-308 by constitutively active PDK-1 [18, 39].

It is interesting that inhibition of PKC β -induced Akt activity did not affect viability of B-CLL cells. These results indicate that Akt activity is not essential for the survival effect of PKC activation and that other pathways induced by PKC are sufficient to maintain cell viability. Whether or not Akt activation is essential for the survival effect of SDF-1 α and IL-4 is presently unknown. Although the inhibition of PI-3K blocks the survival effect of IL-4, LY294002 induces apoptosis in cryopreserved cells with dephosphorylated Akt [4], suggesting the existence of other critical survival pathways downstream of PI-3K. Finally, Bis I but not PKC β inhibitor has additive effects on apoptosis induction when combined with the PI-3K inhibitor. This suggests that when PKC β is inhibited, other PKC-dependent survival pathways remain activated in B-CLL cells.

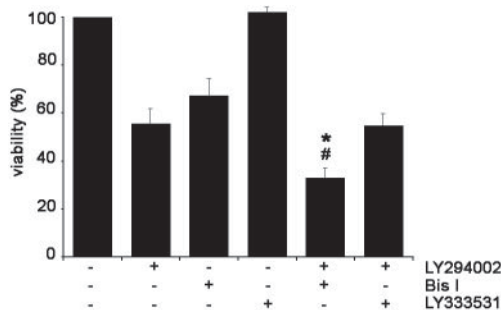


Fig. 7. Effect of the combination of LY294002 with PKC inhibitors. B-CLL cells were incubated with 20 μ M LY294002, 5 μ M Bis I, and 1 μ M LY333531, alone or combinations thereof, for 48 h (n=11). Cell viability was measured by analysis of phosphatidylserine exposure and PI uptake as described in Materials and Methods. Data are shown as the mean value \pm SEM. *, $P < 0.01$, LY294002 + Bis I versus LY294002; #, $P < 0.001$, LY294002 + Bis I versus Bis I.

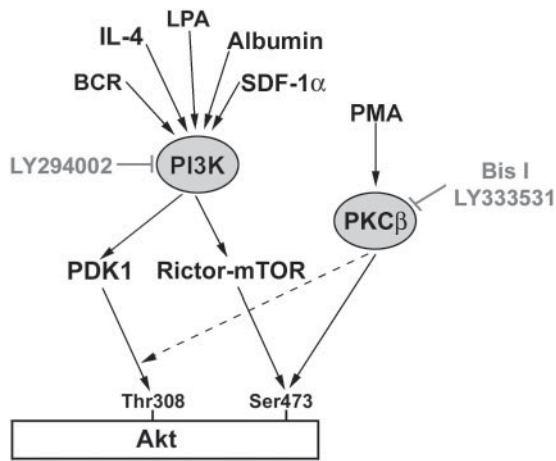


Fig. 8. Signal transduction pathways involved in the activation of Akt in B-CLL cells. Proposed mechanisms for basal and induced Akt activation in response to different survival factors. B-CLL cells present a basal Akt phosphorylation dependent on PI-3K and PKC β basal activities (marked in gray). Different survival factors induce Akt activation in B-CLL cells by two different pathways: the classical pathway (PI-3K-dependent), which is induced by IL-4, SDF-1 α , BCR, and lysophosphatidic acid (LPA), and the novel pathway proposed in this manuscript, which is induced by PKC β activation. Dotted line represents an unknown pathway to explain the increase in Thr-308 phosphorylation induced by PKC β (see Discussion).

In conclusion, these results and those reported previously [2–4] indicate that B-CLL cells have two convergent signal transduction pathways to phosphorylate and activate Akt (**Fig. 8**). The first pathway is PI-3K-dependent and corresponds to the classical PI-3K-Akt pathway described in most models. This pathway is activated by BCR engagement [2], albumin [3], IL-4 [4], lysophosphatidic acid [9], and SDF-1 α (this report; ref. [40]) in B-CLL cells and involves PDK-1 and probably the recently identified Ser-473 kinase Rictor-mTOR complex [24]. The second pathway depends on PKC β , is independent of PI-3K, and contributes to the basal-constitutive Akt activity present in B-CLL cells. Finally, these results suggest that multiple redundant pathways are involved in the survival of B-CLL cells, and that likely, it is necessary to analyze the complex network of survival pathways to select the best therapeutic targets.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by a grant from the Ministerio de Educación y Ciencia and FEDER (SAF2004-00265) to J. G. and by fellowships from the “José Carreras International Foundation Against Leukemia” to M. B., “AGAUR-Generalitat de Catalunya” to M. d. F., and “Ministerio de Educación y Ciencia” to D. I-S., A. F. S., L. C-M., and A. M. C. We thank the Unitat de Biologia (Serveis Científicotècnics, Universitat de Barcelona) for technical support on flow cytometry and R. Rycroft for language assistance.

REFERENCES

1. Barragán, M., Campàs, C., Bellosillo, B., Gil, J. (2003) Protein kinases in the regulation of apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma* **44**, 1865–1870.

2. Bernal, A., Pastore, R. D., Asgary, Z., Keller, S. A., Cesarman, E., Liou, H. C., Schattner, E. J. (2001) Survival of leukemic B cells promoted by engagement of the antigen receptor. *Blood* **98**, 3050–3057.
3. Wickremasinghe, R. G., Ganeshaguru, K., Jones, D. T., Lindsay, C., Spanswick, V. J., Hartley, J. A., Wadhwa, M., Thorpe, R., Hoffbrand, A. V., Prentice, H. G., Mehta, A. B. (2001) Autologous plasma activates Akt/protein kinase B and enhances basal survival and resistance to DNA damage-induced apoptosis in B-chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br. J. Haematol.* **114**, 608–615.
4. Barragán, M., Bellosillo, B., Campàs, C., Colomer, D., Pons, G., Gil, J. (2002) Involvement of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in the survival of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* **99**, 2969–2976.
5. Ringshausen, I., Schneller, F., Bogner, C., Hipp, S., Duyster, J., Peschel, C., Decker, T. (2002) Constitutively activated phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) is involved in the defect of apoptosis in B-CLL: association with protein kinase C δ . *Blood* **100**, 3741–3748.
6. Jones, D. T., Ganeshaguru, K., Anderson, R. J., Jackson, T. R., Bruckdorfer, K. R., Low, S. Y., Palmqvist, L., Prentice, H. G., Hoffbrand, A. V., Mehta, A. B., Wickremasinghe, R. G. (2003) Albumin activates the AKT signaling pathway and protects B-chronic lymphocytic leukemia cells from chlorambucil- and radiation-induced apoptosis. *Blood* **101**, 3174–3180.
7. Cuní, S., Pérez-Aciego, P., Pérez-Chacón, G., Vargas, J. A., Sanchez, A., Martín-Saavedra, F. M., Ballester, S., García-Marco, J., Jorda, J., Durantez, A. (2004) A sustained activation of PI3K/NF- κ B pathway is critical for the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia* **18**, 1391–1400.
8. Plate, J. M. (2004) PI3-kinase regulates survival of chronic lymphocytic leukemia B-cells by preventing caspase 8 activation. *Leuk. Lymphoma* **45**, 1519–1529.
9. Hu, X., Haney, N., Kropp, D., Kabore, A. F., Johnston, J. B., Gibson, S. B. (2005) Lysophosphatidic acid (LPA) protects primary chronic lymphocytic leukemia cells from apoptosis through LPA receptor activation of the anti-apoptotic protein AKT/PKB. *J. Biol. Chem.* **280**, 9498–9508.
10. Nedellec, S., Renaudineau, Y., Bordron, A., Berthou, C., Porakishvili, N., Lydyard, P. M., Pers, J. O., Youinou, P. (2005) B cell response to surface IgM cross-linking identifies different prognostic groups of B-chronic lymphocytic leukemia patients. *J. Immunol.* **174**, 3749–3756.
11. Franke, T. F., Hornik, C. P., Segev, L., Shostak, G. A., Sugimoto, C. (2003) PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene* **22**, 8983–8998.
12. Brazil, D. P., Yang, Z. Z., Hemmings, B. A. (2004) Advances in protein kinase B signaling: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem. Sci.* **29**, 233–242.
13. Fruman, D. A. (2004) Phosphoinositide 3-kinase and its targets in B-cell and T-cell signaling. *Curr. Opin. Immunol.* **16**, 314–320.
14. Luo, J., Manning, B. D., Cantley, L. C. (2003) Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. *Cancer Cell* **4**, 257–262.
15. Altomare, D. A., Testa, J. R. (2005) Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene* **24**, 7455–7464.
16. Cheng, J. Q., Lindsley, C. W., Cheng, G. Z., Yang, H., Nicosia, S. V. (2005) The Akt/PKB pathway: molecular target for cancer drug discovery. *Oncogene* **24**, 7482–7492.
17. Alessi, D. R., Cohen, P. (1998) Mechanism of activation and function of protein kinase B. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**, 55–62.
18. Woodgett, J. R. (2005) Recent advances in the protein kinase B signaling pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**, 150–157.
19. Dong, L. Q., Liu, F. (2005) PDK2: the missing piece in the receptor tyrosine kinase signaling pathway puzzle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **289**, E187–E196.
20. Alessi, D. R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., Hemmings, B. A. (1996) Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.* **15**, 6541–6551.
21. Rane, M. J., Coxon, P. Y., Powell, D. W., Webster, R., Klein, J. B., Pierce, W., Ping, P., McLeish, K. R. (2001) p38 Kinase-dependent MAPKAPK-2 activation functions as 3-phosphoinositide-dependent kinase-2 for Akt in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* **276**, 3517–3523.
22. Feng, J., Park, J., Cron, P., Hess, D., Hemmings, B. A. (2004) Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **279**, 41189–41196.
23. Kawakami, Y., Nishimoto, H., Kitaura, J., Maeda-Yamamoto, M., Kato, R. M., Littman, D. R., Leitges, M., Rawlings, D. J., Kawakami, T. (2004) Protein kinase C β II regulates Akt phosphorylation on Ser-473 in a cell type- and stimulus-specific fashion. *J. Biol. Chem.* **279**, 47720–47725.
24. Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., Sabatini, D. M. (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **307**, 1098–1101.
25. Burger, J. A., Tsukada, N., Burger, M., Zvaifler, N. J., Dell’Aquila, M., Kipps, T. J. (2000) Blood-derived nurse-like cells protect chronic lym-

- phocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood* **96**, 2655–2663.
26. Zhang, H., Zha, X., Tan, Y., Hornbeck, P. V., Mastrangelo, A. J., Alessi, D. R., Polakiewicz, R. D., Comb, M. J. (2002) Phosphoprotein analysis using antibodies broadly reactive against phosphorylated motifs. *J. Biol. Chem.* **277**, 39379–39387.
 27. Jirousek, M. R., Gillig, J. R., Gonzalez, C. M., Heath, W. F., McDonald III, J. H., Neel, D. A., Rito, C. J., Singh, U., Stramm, L. E., Melikian-Badalian, A., Baevsky, M., Ballas L. M., Hall, S. E., Winneroski, L. L., Faul, M. M. (1996) (S)-13-[(Dimethylamino)methyl]-10,11,14,15-tetrahydro-4,9:16, 21-dimetheno-1H, 13H-dibenzo[e,k]pyrrolo[3,4-h][1,4,13]oxadiazacyclohexadecene-1,3(2H)-dione (LY333531) and related analogues: isozyme selective inhibitors of protein kinase C β . *J. Med. Chem.* **39**, 2664–2671.
 28. Li, W., Zhang, J., Flechner, L., Hyun, T., Yam, A., Franke, T. F., Pierce, J. H. (1999) Protein kinase C- α overexpression stimulates Akt activity and suppresses apoptosis induced by interleukin 3 withdrawal. *Oncogene* **18**, 6564–6572.
 29. Tenzer, A., Zingg, D., Rocha, S., Hemmings, B., Fabbro, D., Glanzmann, C., Schubiger, P. A., Bodis, S., Pruschy, M. (2001) The phosphatidylinositolide 3'-kinase/Akt survival pathway is a target for the anticancer and radiosensitizing agent PKC412, an inhibitor of protein kinase C. *Cancer Res.* **61**, 8203–8210.
 30. Glik, G., Wheeler-Jones, C., Zachary, I. (2002) Vascular endothelial growth factor induces protein kinase C (PKC)-dependent Akt/PKB activation and phosphatidylinositol 3'-kinase-mediated PKC δ phosphorylation: role of PKC in angiogenesis. *Cell Biol. Int.* **26**, 751–759.
 31. Bae, Y. S., Kim, Y., Park, J. C., Suh, P. G., Ryu, S. H. (2002) The synthetic chemoattractant peptide, Trp-Lys-Tyr-Met-Val-D-Met, enhances monocyte survival via PKC-dependent Akt activation. *J. Leukoc. Biol.* **71**, 329–338.
 32. Kroner, C., Eybrechts, K., Akkerman, J. W. (2000) Dual regulation of platelet protein kinase B. *J. Biol. Chem.* **275**, 27790–27798.
 33. Kim, S., Jin, J., Kunapuli, S. P. (2004) Akt activation in platelets depends on Gi signaling pathways. *J. Biol. Chem.* **279**, 4186–4195.
 34. Bauer, B., Jenny, M., Fresser, F., Uberall, F., Baier, G. (2003) AKT1/PKB α is recruited to lipid rafts and activated downstream of PKC isotypes in CD3-induced T cell signaling. *FEBS Lett.* **541**, 155–162.
 35. Blalock, W. L., Navolanic, P. M., Steelman, L. S., Shelton, J. G., Moye, P. W., Lee, J. T., Franklin, R. A., Mirza, A., McMahon, M., White, M. K., McCubrey, J. A. (2003) Requirement for the PI3K/Akt pathway in MEK1-mediated growth and prevention of apoptosis: identification of an Achilles heel in leukemia. *Leukemia* **17**, 1058–1067.
 36. Chiorazzi, N., Rai, K. R., Ferrarini, M. (2005) Chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* **352**, 804–815.
 37. Alkan, S., Huang, Q., Ergin, M., Denning, M. F., Nand, S., Maududi, T., Paner, G. P., Ozpuyan, F., Izban, K. F. (2005) Survival role of protein kinase C (PKC) in chronic lymphocytic leukemia and determination of isoform expression pattern and genes altered by PKC inhibition. *Am. J. Hematol.* **79**, 97–106.
 38. Kim, D. W., Hwang, J. H., Suh, J. M., Kim, H., Song, J. H., Hwang, E. S., Hwang, I. Y., Park, K. C., Chung, H. K., Kim, J. M., Park, J., Hemmings, B. A., Shong, M. (2003) RET/PTC (rearranged in transformation/papillary thyroid carcinomas) tyrosine kinase phosphorylates and activates phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1): an alternative phosphatidylinositol 3-kinase-independent pathway to activate PDK1. *Mol. Endocrinol.* **17**, 1382–1394.
 39. Scheid, M. P., Marignani, P. A., Woodgett, J. R. (2002) Multiple phosphoinositide 3-kinase-dependent steps in activation of protein kinase B. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 6247–6260.
 40. Nishio, M., Endo, T., Tsukada, N., Ohata, J., Kitada, S., Reed, J. C., Zvaifler, N. J., Kipps, T. J. (2005) Nucleolar cells express BAFF and APRIL, which can promote survival of chronic lymphocytic leukemia cells via a paracrine pathway distinct from that of SDF-1 α . *Blood* **106**, 1012–1020.

Akt inhibitors induce apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells

Mercè de Frias,¹ Daniel Iglesias-Serret,¹ Ana M. Cosialls,¹ Llorenç Coll-Mulet,¹ Antonio F. Santidrián,¹ Diana M. González-Gironès,¹ Esmeralda de la Banda,² Gabriel Pons,¹ and Joan Gil¹

¹Departament de Ciències Fisiològiques II, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), Universitat de Barcelona, L'Hospitalet de Llobregat, and ²Servei d'Hematologia, IDIBELL-Hospital de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Spain

ABSTRACT

Background

The phosphatidylinositol-3-kinase/Akt pathway has been described to be critical in the survival of chronic lymphocytic leukemia cells. In this study we analyzed the effect of two selective chemical inhibitors of Akt (Akti-1/2 and A-443654) on the survival of chronic lymphocytic leukemia cells.

Design and Methods

Using cytometry we studied the cytotoxic effects of Akt inhibitors on peripheral B and T lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia and from healthy donors. We studied the changes induced by Akti-1/2 and A-443654 at the mRNA level by performing reverse transcriptase multiplex ligation-dependent probe amplification. We also studied the changes induced by both Akt inhibitors in some BCL-2 protein family members on chronic lymphocytic leukemia cells by western blotting. Moreover, we analyzed the cytotoxic effect of Akt inhibitors in patients' cells with deleted/mutated *TP53*.

Results

Both inhibitors induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells in a dose-dependent manner. Moreover, B cells from patients with chronic lymphocytic leukemia were more sensitive to Akt inhibitors than T cells from leukemic patients, and B or T cells from healthy donors. Survival factors for chronic lymphocytic leukemia cells, such as interleukin-4 and stromal cell-derived factor-1 α , were not able to block the apoptosis induced by either Akt inhibitor. Akti-1/2 did not induce any change in the mRNA expression profile of genes involved in apoptosis, while A-443654 induced some changes, including an increase in *NOXA* and *PUMA* mRNA levels, suggesting the existence of additional targets for A-443654. Both inhibitors induced an increase in *PUMA* and *NOXA* protein levels, and a decrease in *MCL-1* protein level. Moreover, Akti-1/2 and A-443654 induced apoptosis irrespective of *TP53* status.

Conclusions

These results demonstrate that Akt inhibitors induce apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells and might be a new therapeutic option for the treatment of chronic lymphocytic leukemia.

Key words: Akt, chronic lymphocytic leukemia, apoptosis.

Citation: de Frias M, Iglesias-Serret D, Cosialls AM, Coll-Mulet L, Santidrián AF, González Gironès DM, de la Banda E, Pons G, and Gil J. Akt inhibitors induce apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica* 2009; 94:1698-1707. doi:10.3324/haematol.2008.004028

©2009 Ferrata Storti Foundation. This is an open-access paper.

Acknowledgments: the authors thank Alba Pérez Perarnau, Camila Rubio and Dr. Esther Castaño for helpful discussions and suggestions; Michael Maudsley for language assistance; and Abbott for kindly providing A-443654. We also thank the Unitat de Biologia and the Unitat de Genòmica from the Serveis Científicotècnics at the Universitat de Barcelona for their technical support.

Funding: this study was supported by grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación and FEDER (SAF2007-60964), the Ministerio de Sanidad y Consumo (ISCIII-RTICC RD06/0020), and the AGAUR-Generalitat de Catalunya (2005SGR-00549). MdeF is a recipient of a fellowship from the AGAUR-Generalitat de Catalunya, AMC and DMGG are recipients of research fellowships from the Ministerio de Educación y Ciencia. DIS and LCM are recipients of fellowships from the José Carreras International Leukemia Foundation (FIJC-07/ESP-FCAJAMADRID).

Manuscript received November 25, 2008. Revised version arrived June 4, 2009. Manuscript accepted June 10, 2009.

Correspondence: Joan Gil, Ph.D., Departament de Ciències Fisiològiques II, IDIBELL-Universitat de Barcelona, Campus de Bellvitge, Pavelló de Govern, 4^a planta, E-08907 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain. E-mail: jgil@idibell.cat

The online version of this article contains a supplementary appendix.

Introduction

The phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) pathway has been described to be critical in the survival of chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells.¹⁻¹¹ PI3K phosphorylates the D-3 position of phosphatidylinositol, phosphatidylinositol 4-phosphate and phosphatidylinositol 4,5-diphosphate. The cellular levels of PI3K products are controlled by the balance between PI3K activity and the phosphatase activity of PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten).¹² Interestingly, PTEN protein is reduced or not detected in 48% of patients with CLL.¹³

One of the most important targets of PI3K products is the serine-threonine kinase Akt, also known as protein kinase B (PKB).¹⁴ Akt resides in the cytosol in a low-activity conformation, and it is activated through recruitment to cell membranes by PI3K lipid products and phosphorylation at Thr308 and Ser473. Once Akt is activated, it is able to promote cell survival through phosphorylation and inactivation of key components in the apoptotic cascade. Akt substrates include the members of the Forkhead family of transcription factors¹⁵ and glycogen synthase kinase-3 (GSK-3),¹⁶ which are inhibited by Akt. Furthermore, GSK-3 inhibition induces the up-regulation of the anti-apoptotic protein MCL-1.¹⁶ Activation of the PI3K/Akt pathway in CLL cells induces the phosphorylation of the Forkhead family member FoxO3a and GSK-3, and an increase in MCL-1 protein, while inhibition of PI3K induces a loss of cell viability, dephosphorylation of FoxO3a and GSK-3, and a decrease in the level of MCL-1 protein.^{3,4,11} Importantly, a stronger activation of Akt pathway has been related to a higher capacity for cell cycle progression in CLL cells from patients with progressive disease.¹⁷ All together, these studies suggest that Akt plays a prominent role in the survival of CLL; however, the effect of selective chemical Akt inhibitors on the survival of CLL cells has not been reported yet.

A-443654 is a potent, ATP competitive and reversible inhibitor of Akt catalyzed phosphorylation activity. It is a pan-Akt inhibitor and has equal potency against Akt1, Akt2 or Akt3.^{18,19} Together with the decrease in phosphorylation of Akt targets, a concomitant increase in the phosphorylation of Ser473 and Thr308 Akt residues has been observed. This increase is PI3K-dependent, as demonstrated by the fact that incubating the cells with LY294002 blocks it.²⁰ Recently, it was reported that this inhibitor also inhibits other protein kinases, albeit with slightly lower potency, such as PKA, PRK2, MSK1 and DYRK1A.²¹ It was also reported that Akti-1/2, an ATP non-competitive Akt inhibitor, was a highly selective Akt inhibitor, blocking Akt1 and Akt2 but not Akt3 activity; the pleckstrin homology domain is required for the activity of this inhibitor.^{22,23}

In this study we examined the effect of these two Akt inhibitors on CLL cells.

Design and Methods

Patients with chronic lymphocytic leukemia, healthy donors and cell isolation

Samples from patients with CLL (Table 1) or healthy donors were studied. CLL was diagnosed according to standard clinical and laboratory criteria. Blood samples were obtained from the Hospital de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Spain. Written informed consent was obtained from all patients in accordance with the Hospital de Bellvitge Ethical Committee's requirements.

Mononuclear cells from peripheral blood samples were isolated by centrifugation on a Ficoll-Hypaque (Seromed, Berlin, Germany) gradient and cryopreserved in liquid nitrogen in the presence of 10% dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), and are referred to as CLL cells throughout this article. B-cells (CD19⁺ cells) were purified from samples from three patients (n. 49, 50 and 51) by using the RosetteSep Human B Cell Enrichment Cocktail (StemCell Technologies, Vancouver, Canada). Blood samples or isolated mononuclear cells were incubated with RosetteSep Human B Cell Enrichment Cocktail at 50 μ L/mL for 20 min prior to centrifugation on a Ficoll-Hypaque, according to the manufacturer's protocol.

Immunological and genetic analyses

CD38 and ZAP-70 were determined by flow cytometry in fixed cells with conjugated antibodies (PE clone HB7, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA and Alexa-Fluor 488, Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA, respectively). CD19 was determined by flow cytometry with a conjugated antibody [phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD19; Becton Dickinson].

Genomic alterations were detected by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). Fluorescent-labeled DNA probes were used in interphase cytogenetic analyses. Locus-specific probes (LSI P53/Spectrum-Orange, LSI ATM/Spectrum-Green, LSI 13S319/Spectrum-Orange, LSI 13q34/SpectrumAqua) were used to determine loss of these genetic regions within interphase nuclei. Trisomy 12 was detected in interphase nuclei using a chromosomal centromere enumeration probe (CEP) labeled with Spectrum-Green. These five probes are packaged together in a commercially available kit (Vysis Chronic Lymphocytic Leukemia Multicolor Kit) and were used in accordance with the manufacturer's specifications. Cells were fixed with fresh fixative before placement onto slides. The probe mixture was applied directly to slides. These slides were denatured at 74°C for 2 min and incubated overnight at 37°C. Slides were then washed with 0.4 x saline sodium citrate-0.3% nonidet P-40 (NP-40) at 73 \pm 1°C for 2 min and 2 x saline sodium citrate-0.1% nonidet P-40 at room temperature for 1 min. 4'6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) II counterstain was applied to the target area. Slides were stored at 20°C in the dark. Two hundred nuclei were analyzed for each probe, using a NIKON fluorescent microscope. Cut-off levels used were 5% for CEP 12 and 7% for locus-specific probes. The karyotype of all samples was determined.

Table 1. Characteristics of the chronic lymphocytic leukemia patients studied.

Patient	Age/Sex (x10 ⁹ /L)	WBC	Lymphocytes (%)	CD19 ⁺ (%)	CD38 ⁺ (%)	ZAP70 ⁺ (%)	Genomic alterations	F/T	EC ₅₀ (LIM) Akti-1/2	EC ₅₀ (LIM) A-443654
1	75/F	41	78	77	2	ND	ND	F		
2	63/F	71	84	72	28	53	ND	F	7.5	
3	64/F	100	76	96	87	40	del13q, del17p	T		
4	72/M	49	96	84	2	0.56	del13q	F		
5	76/F	27	84	75	15	3	ND	F	9	0.75
6	71/M	94	94	88	16	26	normal	F		0.7
7	61/M	76	84	82	2	6	ND	F		0.6
8	70/M	98	94	86	2	5	del17p	F	8	0.6
9	77/F	137	68	90	10	14	normal	F		0.45
10	73/F	82	88	80	20	5	ND	F		0.65
11	74/F	31	93	89	ND	14	ND	F		0.4
12	65/M	16	93	83	91	38	normal	F		0.5
13	57/M	31	84	79	50	2	del11q	F		0.8
14	61/F	90	96	80	9	5	normal	T	12.5	0.65
15	50/M	60	94	80	30	6	del13q	T	10	0.85
16	71/F	77	84	86	6	12	normal	T	13	0.75
17	66/F	91	95	73	20	28	del13q	F	8.5	0.55
18	66/F	44	86	80	4	14	ND	T	11	0.75
19	81/F	76	92	85	51	27	ND	T	8	0.45
20	70/M	58	94	70	12	10	del13q	F	12	
21	82/M	67	80	80	78	0.05	ND	F	13	
22	75/F	93	84	90	4	0.64	del13q	F	15	
23	85/F	100	80	80	12	22	del13q	F	7	
24	63/F	56	91	83	13	1.5	normal	T		0.4
25	75/M	83	89	82	35	15	del13q	F		
26	53/M	113	94	94	51	10	del13q	T		0.5
27	59/F	89	90	80	7	34	normal	F	5	0.75
28	81/F	22	92	72	5	3	ND	F	6	0.65
29	86/M	22	89	71	28	42	ND	F		0.7
30	69/M	53	87	74	ND	ND	del13q	T		0.5
31	56/M	55	95	72	70	53	del13q, del11q	T	12	
32	54/M	30	73	48	13	54	ND	T	12.5	0.8
33	71/F	54	74	80	9	44	del13q	T	10	0.85
34	81/F	31	83	79	7	7	normal	T		
35	72/M	37	86	74	2	1	normal	F		
36	74/M	590	97	ND	24	52	tris12	T		
37	85/M	31	87	80	30	50	ND	F		0.4
38	71/M	48	87	87	18	4	normal	F		
39	54/M	132	93	88	19	14	normal	T		0.5
40	70/M	131	98	86	93	39	del17p, del11q	T		
41	73/F	18	86	ND	24	29	del17p	T	5	
42	81/M	24	95	85	60	31	tris12, del11q	T		
43	66/F	44	86	80	4	14	ND	T	12	0.8
44	80/M	96	93	80	2	0.48	del13q, del11q	T		
45	74/F	43	94	87	10	8	del13q	T		
46	58/M	74	89	90	24	6	del13q	T		
47	70/M	79	84	91	ND	ND	del13q	T		
48	78/M	85	95	84	ND	ND	tris12	T		
49	64/M	88	95	97	ND	10	del13q	F		
50	67/F	88	90	96	20	28	del13q	F		
51	72/M	51	92	97	7	26	ND	F		

WBC: white blood cell count; F: female; M: male; del: deletion; tris: trisomy and ND: not determined; F: fresh cells; T: frozen-thawed cells.

Reagents

Akti-1/2 (previously known as Akt-I-1/2) was purchased from Calbiochem-Novabiochem (San Diego, CA, USA), A-443654 was kindly provided by Abbott (North Chicago, IL, USA), recombinant human interleukin-4 (IL-4) and stromal cell-derived factor-1 α (SDF-1 α) were purchased from Immunotools (Friesoythe, Germany), annexin V-fluorescein isothiocyanate and propidium iodide were from Bender MedSystems (Vienna, Austria). Nutlin-3a was provided by Hoffmann-La Roche. Z-VAD.fmk was purchased from Bachem (Bubendorf, Switzerland). Ethanol and RNase A were from Sigma-Aldrich.

Cell culture

Lymphocytes were cultured immediately after thawing or isolation in RPMI 1640 culture medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 100 U penicillin and 100 ng/mL streptomycin at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. To avoid differences in cell viability due to the cell concentration, flow cytometry experiments were performed at a concentration of 1 \times 10⁶ cells/mL, whereas the concentration used for reverse transcriptase multiplex ligation-dependent probe amplification (RT-MLPA) and the experiments to obtain cell extracts to perform western blotting was 2.5 to 3 \times 10⁶ cells/mL.

Analysis of apoptosis by flow cytometry

Apoptosis was assessed by exposure of phosphatidylserine and membrane integrity. This was determined by annexin V-fluorescein isothiocyanate and propidium iodide double staining. Flow cytometric analysis was performed using FACSCalibur and CellQuest software (Becton Dickinson), as described previously.²⁴ Cell viability was measured as the percentage of annexin V and propidium iodide double-negative cells. The results of flow cytometric analysis of three representative samples are shown in *Online Supplementary Figure S1A*.

To analyze apoptosis in T cells and B cells from the samples, 5 \times 10⁵ cells were incubated for 24 h with the indicated factors. Cells were then washed in annexin-binding buffer, and incubated in 50 μ L annexin-binding buffer with allophycocyanin-conjugated anti-CD3 and phycoerythrin-conjugated anti-CD19 from Becton Dickinson, for 10 min in the dark. Cells were then diluted with annexin-binding buffer to a volume of 150 μ L and incubated with 1 μ L annexin V-fluorescein isothiocyanate for 15 min in the dark. Cells were analyzed using FACSCalibur and CellQuest software. Results of flow cytometric analysis of one CLL sample and one sample from a healthy donor are shown in *Online Supplementary Figure S1B*.

Apoptosis in T cells and B cells was also assessed by subdiploid DNA analysis. Briefly, 1 \times 10⁶ cells were harvested, washed twice in phosphate-buffered saline containing 1% fetal bovine serum (PBS/1% FBS) and fixed in 70% ethanol. The cells were centrifuged,

washed in PBS/1% FBS, and resuspended in 0.5 mL PBS/1% FBS, containing allophycocyanin-conjugated anti-CD3 or allophycocyanin-conjugated anti-CD19. Tubes were incubated for 20 min at room temperature in the dark and then propidium iodide (50 μ g/mL) and RNase A (100 μ g/mL) were added and incubated for 30 min at room temperature in the dark before flow cytometry analysis to identify the sub-G₀ peak corresponding to apoptosis in CD3⁺ or CD19⁺ cells. Cells were analyzed using FACSCalibur and CellQuest software.

Western blot analysis

Cells were lysed with Laemmli sample buffer, and western blotting was performed as described previously.² We used antibodies against p53 (Ab-5, Neomarkers, Fremont, CA, USA), MCL-1 and Akt (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), BCL-2 (Dako, A/S, Glostrup, Denmark), PUMA and NOXA (Abcam, Cambridge, UK), P-Ser473-Akt, P-GSK-3 α / β and P-FoxO1/FoxO3a (Cell Signaling Technologies, Beverly, MA, USA), and β -actin (Sigma-Aldrich). Antibody binding was detected using a secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase and an enhanced chemiluminescence detection system (Amersham, Buckinghamshire, UK).

Reverse transcriptase multiplex ligation-dependent probe amplification

RNA was analyzed by RT-MLPA using a SALSA MLPA KIT R011 Apoptosis mRNA from MRC-Holland (Amsterdam, The Netherlands) for the simultaneous detection of 38 mRNA molecules.²⁵ In brief, RNA samples (200 ng total RNA) were first reverse transcribed using a gene-specific probe mix. The resulting cDNA was annealed overnight at 60°C to the MLPA probe mix. Annealed oligonucleotides were ligated by adding Ligase-65 (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) and incubated at 54°C for 15 min. Ligation products were amplified by polymerase chain reaction (PCR; 35 cycles, 30 s at 95°C; 30 s at 60°C, and 1 min at 72°C) with one unlabeled and one FAM labeled primer. The final PCR fragments amplified were separated by capillary electrophoresis on a 48-capillary ABI-Prism 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems/Hitachi, Foster City, CA, USA). Peak area and height were measured using GeneScan analysis software (Applied Biosystems). The sum of all peak data was set at 100% to normalize for fluctuations in total signal between samples, and individual peaks were calculated relative to the 100% value.

Statistical analysis

Results are shown as the mean \pm standard error of the mean (SEM) of values obtained in independent experiments. The paired Student's *t* test was used to compare differences between paired samples. Data were analyzed using the SPSS 14.0 software package (Chicago, IL, USA).

Results

Akti-1/2 and A-443654 inhibit Akt in chronic lymphocytic leukemia cells

To assess the effect of Akti-1/2 and A-443654 on Akt activity in CLL cells, we examined the phosphorylation status of Akt or Akt substrates which are used to assess the activation status of Akt. Akti-1/2 inhibited Ser473 phosphorylation in a dose-dependent manner (Figure 1A). As previously described for other cell types,^{18,20} A-443654 induced an increase in Ser473 phosphorylation. In order to confirm that A-443654 was inhibiting Akt, we analyzed the status of the Akt substrates GSK3 α/β and FoxO1/FoxO3a. Both inhibitors reduced the phosphorylation of GSK3 α/β and FoxO1/FoxO3a (Figure 1B), demonstrating that they inhibited Akt activity.

Akt inhibitors induce apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells

To examine the ability of Akt inhibitors to induce apoptosis in CLL cells, we incubated CLL cells with a

range of concentrations of Akti-1/2 (0.5-20 μM) and A-443654 (0.1-1 μM) for 24 h and measured cell viability. Both inhibitors induced apoptosis in a dose-dependent manner (Figure 2A and 2B) and in a time-dependent manner (*Online Supplementary Figure S2*). The half-maximal effective concentration (EC_{50}) was $9.85 \pm 0.67 \mu\text{M}$ (range, 5 to 15 μM) for Akti-1/2, and $0.63 \pm 0.03 \mu\text{M}$ (range, 0.40 to 0.85 μM) for A-443654. Similar results were obtained in purified CD19⁺ CLL cells (*Online Supplementary Figure S3*). Akti-1/2 and A-443654 induced apoptosis in all the analyzed samples, independently of sex, ZAP70 status, CD38 status or genomic alterations (*data not shown*).

Differential effect of Akt inhibitors on B and T cells from patients with chronic lymphocytic leukemia and healthy donors

Next, we analyzed the sensitivity of normal B and T cells to Akt inhibitors, in terms of induction of apoptosis. The number of apoptotic T cells (CD3⁺ cells) was measured in CLL samples and blood samples from healthy donors exposed to several doses of Akti-1/2

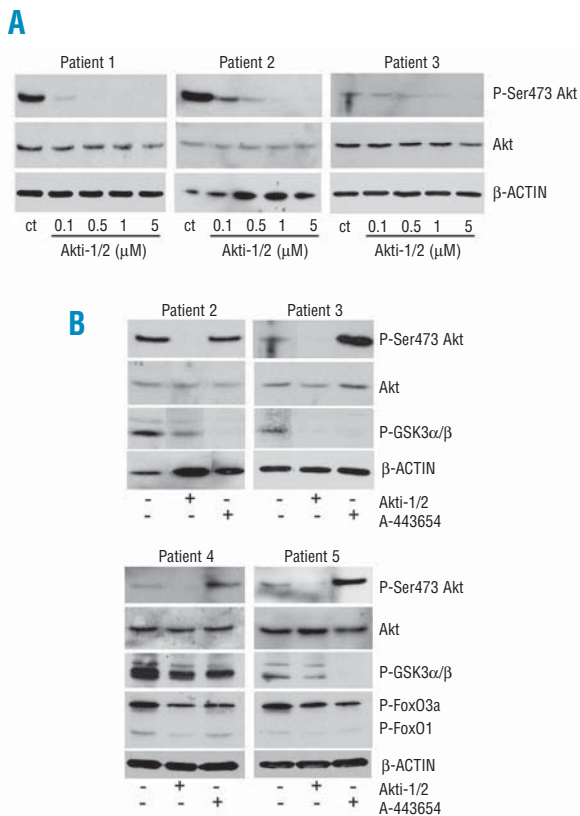


Figure 1. Akti-1/2 and A-443654 effects on the phosphorylation of Akt and Akt substrates. CLL cells were incubated with or without a range of doses of Akti-1/2 for 2 h. (A) Cells were lysed and whole extracts were analyzed by western blot as described in the Design and Methods section. Results from three patients are shown (n=3). (B) CLL cells were incubated with or without 5 μM Akti-1/2 and 0.5 μM (patients 2, 4 and 5) or 1 μM (patient 3) A-443654 for 2 h. Cells were lysed and whole extracts were analyzed by western blot as described in the Design and Methods section. Results from four representative patients are shown (n=9).

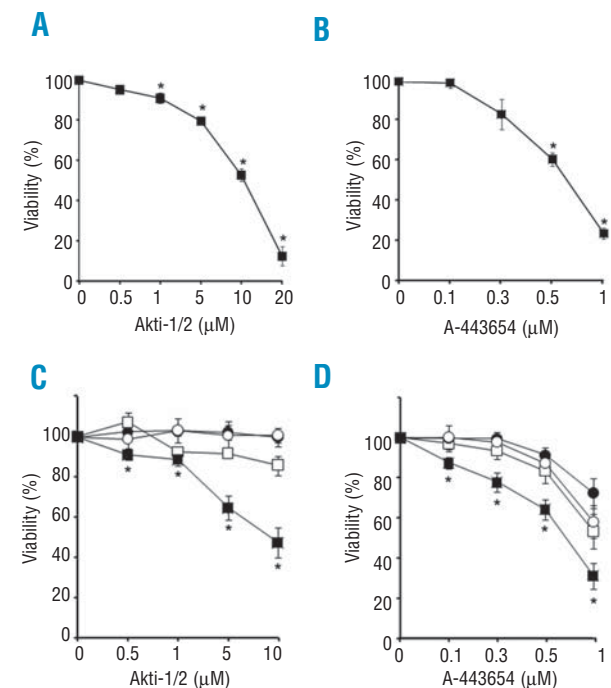


Figure 2. Cytotoxic effect of Akt inhibitors on CLL cells and on peripheral blood lymphocytes (PBL) from healthy donors. Cells from CLL patients were incubated for 24 h with or without various doses of Akti-1/2 (A, n=15) and A-443654 (B, n=15). Viability was measured by analysis of phosphatidylserine exposure and PI uptake as described in the Design and Methods section. Cells from CLL patients and healthy donors were incubated for 24 h with or without various doses of Akti-1/2 (C, n=9 and n=3, respectively) and A-443654 (D, n=13 and n=8, respectively). Viability was measured as non-apoptotic CD3⁺/CD19⁻ T cells from PBL (○) and CLL (●) or CD3⁺/CD19⁻ B cells from PBL (□) and CLL (■) as described in the Design and Methods section. Viability is expressed as the percentage of the viability of untreated cells. Data are shown as the mean value \pm SEM. * $p < 0.005$, treated versus untreated cells (A, B), or B cells versus T cells from patients with CLL (C, D).

(up to 10 μM) and A-443654 (up to 1 μM) for 24 h. Incubation with 5 μM Akti-1/2 reduced the percentage of viable CLL cells to $64.64 \pm 6.12\%$. In contrast, the percentage of viable T cells from CLL samples was $102.4 \pm 3.46\%$. Interestingly, B and T cells derived from healthy donors were resistant to Akti-1/2-induced apoptosis. Thus, after incubation with 5 μM Akti-1/2 the percentage of viable B cells and T cells were $91.6 \pm 2.1\%$ and $100.7 \pm 7.2\%$, respectively (Figure 2C). Similar results were obtained in the treatment of CLL cells and cells from healthy donors with A-443654, but the difference between CLL cells and B or T cells from healthy donors was less pronounced than in the case of Akti-1/2. Incubation with 0.5 μM A-443654 reduced the percentage of viable CLL cells to $64.2 \pm 4.9\%$. In contrast, the percentage of viable T cells was $91.3 \pm 3.7\%$. Furthermore, B and T cells derived from

healthy donors were less sensitive than cells from CLL samples to A-443654-induced apoptosis. Thus, after incubation with 0.5 μM A-443654 the percentages of viable B and T cells were $83.4 \pm 5.8\%$ and $87.1 \pm 5.9\%$, respectively (Figure 2D). Similar results were obtained when CLL cells and cells from healthy donors were treated for 48 h with both Akt inhibitors (*Online Supplementary Figure S4*). We confirmed this differential induction of apoptosis between CLL cells and normal lymphocytes by performing an analysis of the DNA content. We observed that CLL cells were more sensitive than T cells and normal B cells to the Akt inhibitor-induced increase in sub- G_0 peak (*Online Supplementary Figure S5*). These results indicate that B cells from CLL samples are more sensitive than normal B and T cells to Akt inhibitor-induced apoptosis.

Effect of survival factors in combination with Akt inhibitors

We studied the effect of two well-known survival factors in CLL cells, IL-4²⁶ and SDF-1 α ,²⁷ in combination with Akt inhibitors. We used selected CLL samples in which these factors induced a survival effect. Thus, we treated CLL cells with 10 ng/mL IL-4 (Figure

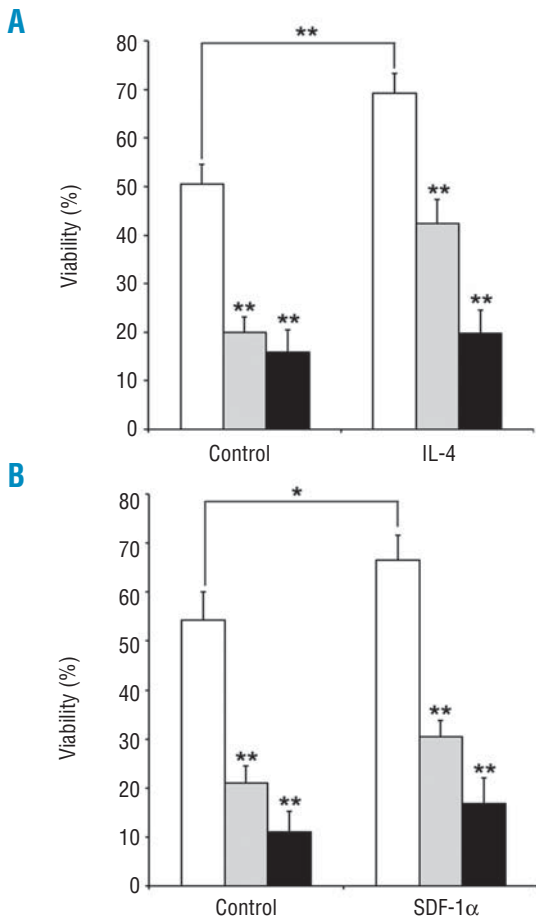


Figure 3. Effect of survival signals on the apoptotic activity of Akt inhibitors. CLL cells were untreated or treated with 10 ng/mL IL-4 (A, $n = 10$) or 50 ng/mL SDF-1 α (B, $n = 7$) without (white filled bars) or with 10 μM Akti-1/2 (gray filled bars) or 0.5 μM A-443654 (black filled bars) for 48 h. Viability was measured by analysis of phosphatidylserine exposure and propidium iodide uptake as described in the Design and Methods section. Data are shown as the mean value \pm SEM. ** $p < 0.001$ control versus IL-4 and Akt inhibitors treated cells versus control, IL-4 or SDF-1 α ; * $p < 0.01$ control versus SDF-1 α -treated cells.

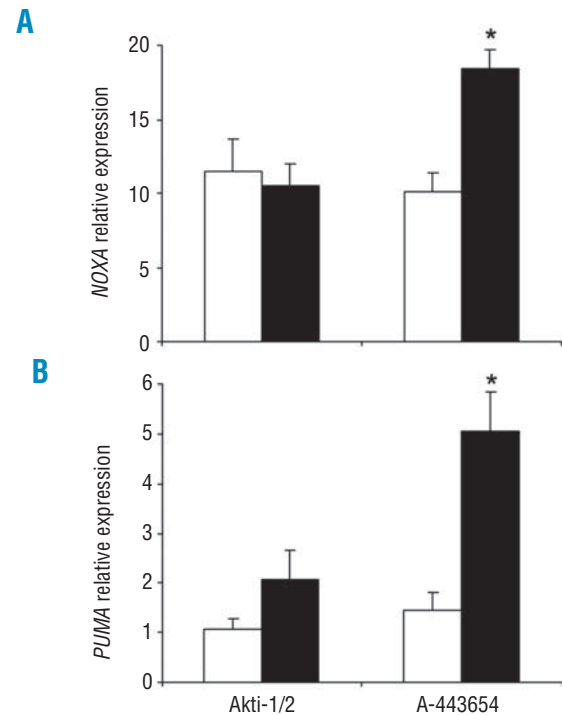


Figure 4. Apoptosis-related gene expression profile induced by Akti-1/2 and A-443654. Cells from CLL patients were untreated (open bars) or treated with 5 μM Akti-1/2 or 0.5 μM A-443654 (black filled bars) for 24 h. Cells were lysed, and NOXA (A) and PUMA (B) mRNA expression was analyzed by RT-MLPA as described in the Design and Methods section. The results are shown as the mean value \pm SEM of four and eight different experiments for Akti-1/2 and A-443654, respectively. * $p < 0.005$ treated versus untreated cells.

3A) or 50 ng/mL SDF-1 α (Figure 3B) and with or without 10 μ M Akti-1/2 or 0.5 μ M A-443654 for 48 h, and then measured cell viability. Neither IL-4 nor SDF-1 α was able to inhibit the apoptosis induced by both Akt inhibitors. These results show that Akt inhibitors can induce apoptosis in CLL cells even in the presence of survival signals.

Characterization of Akt inhibitor-induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemia

We investigated the effect of Akt inhibitors on the overall apoptosis mRNA expression profile by performing RT-MLPA.²⁵ Treatment of CLL cells with 5 μ M

Akti-1/2 for 24 h did not induce any significant change in the RT-MLPA profile (Figure 4 and *Online Supplementary Figure S6A*). The results indicated that Akt inhibition has minimal effects on the apoptosis mRNA expression profile. Surprisingly, incubation of CLL cells with 0.5 μ M A-443654 for 24 h induced an increase in the mRNA levels of *NOXA* and *PUMA* and a decrease in the mRNA levels of *BMF*, *BID*, one *BAX* probe, *BCLw*, *NAIP*, *AIF*, *APAF* and *APAF_L* (Figure 4 and *Online Supplementary Figure S6B*). Similar results were obtained in purified CD19⁺ CLL cells (*Online Supplementary Figure S7*). Thus, A-443654-induced mRNA changes are likely independent of its activity of inhibiting Akt.

We then investigated the effect of Akt inhibitors on the expression of BCL-2 family proteins. Western blot analysis revealed that Akti-1/2 and A-443654 increased

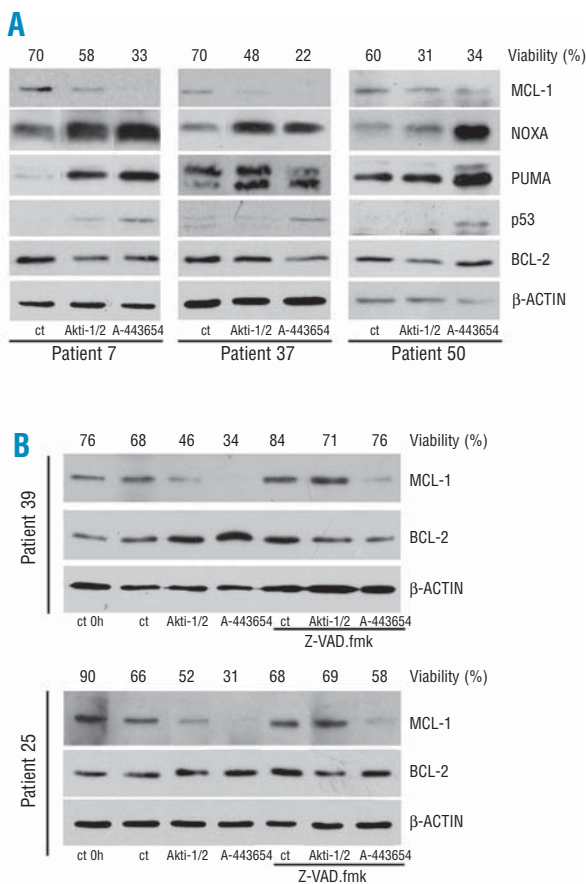


Figure 5. Apoptosis profile induced by Akti-1/2 and A-443654. (A) Apoptosis-related protein expression profile induced by Akti-1/2 and A-443654. Cells were untreated (ct) or treated with 5 μ M Akti-1/2 (n = 10) and 0.5 μ M A-443654 (n = 13) for 24 h, and MCL-1, NOXA, PUMA, p53 and BCL-2 expression was determined by western blot. Cell viability is expressed at the top of the figure. β -actin was used to standardize protein levels. Results from three representative patients are shown, two corresponding to Ficoll isolated cells (patients 7 and 37) and one corresponding to purified CD19⁺ CLL cells (patient 50). (B) Effect of Z-VAD.fmk on Akti-1/2 and A-443654-induced MCL-1 decrease. Cells were pretreated with or without 200 μ M Z-VAD.fmk for 30 min and then treated with 5 μ M Akti-1/2 and 0.5 μ M A-443654 for 24 h (results from two representative patients are shown, n = 3), and MCL-1 levels were determined by western blot. BCL-2 and β -actin were used to standardize protein levels. Cell viability is expressed at the top of the figure.

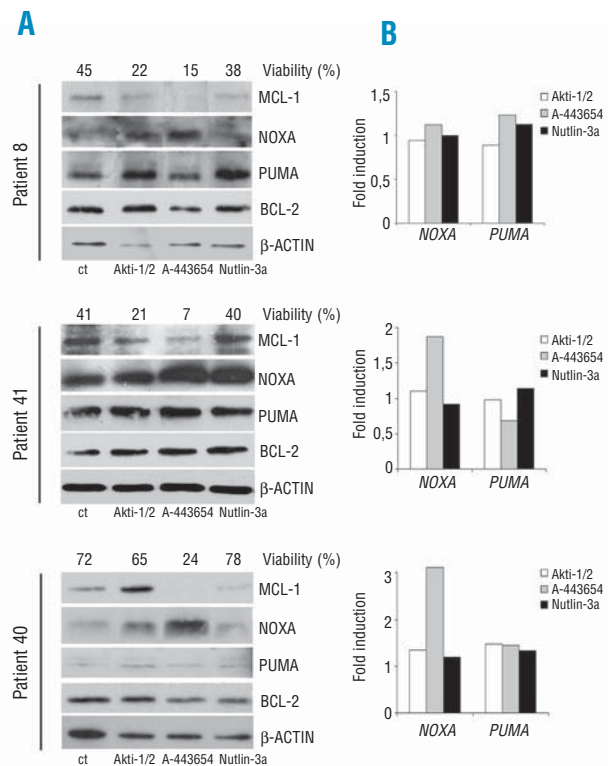


Figure 6. Apoptosis profile induced by Akti-1/2 and A-443654 in TP53 deleted/mutated samples. (A) Protein expression profile and cytotoxic effect of Akti-1/2, A-443654 and Nutlin-3a. Cells were untreated (ct) or treated with 5 μ M Akti-1/2, 0.5 μ M A-443654 or 5 μ M Nutlin-3a for 24 h, and MCL-1, NOXA and PUMA expression was determined by western blot. BCL-2 and β -actin were used to standardize protein levels. Viability was measured by analysis of phosphatidylserine exposure and propidium iodide uptake as described in the Design and Methods section. (B) Apoptosis-related gene expression profile induced by Akti-1/2 and A-443654 in TP53 deleted/mutated CLL samples. Cells were untreated or treated with 5 μ M Akti-1/2 (white filled bars) or 0.5 μ M A-443654 (gray filled bars) and 5 μ M Nutlin-3a (black filled bars) for 24 h. Cells were lysed, and the expression of apoptosis-related genes was analyzed by RT-MLPA as described in the Design and Methods section. The results are shown as fold induction relative to untreated cells.

NOXA protein levels and decreased MCL-1 protein levels in all the samples analyzed. PUMA protein levels were also increased in 50% of the samples after treatment with Akt inhibitors (Figure 5A). Furthermore, p53 protein was increased by A-443654 but not by Akti-1/2 in all the samples analyzed.

We further analyzed the apoptosis-related protein expression profile induced by Akti-1/2 and A-443654 at different times. We did not observe any change in MCL-1, NOXA and PUMA protein levels after 3 h of treatment with Akt inhibitors (*data not shown*). NOXA protein was increased by Akt inhibitors at 6 h while PUMA protein levels were increased at 12 h. Moreover, MCL-1 protein was decreased after incubation with A-443654 for 6 h (*Online Supplementary Figure S8*). Finally, pretreatment with 200 μ M Z-VAD.fmk for 30 min blocked the decrease in MCL-1 induced by Akti-1/2 but not that induced by A-443654 (Figure 5B). These results demonstrate that the decrease in MCL-1 induced by Akti-1/2 is caspase-dependent whereas that induced by A-443654 is caspase-independent and precedes the activation of caspases.

Akti-1/2 and A-443654 induce apoptosis irrespective of TP53 status in chronic lymphocytic leukemia cells

To study the role of p53 in Akti-1/2 and A-443654-induced apoptosis we analyzed the effect of these compounds on CLL samples with deleted/mutated *TP53*. Patients' samples with deleted/mutated *TP53* or altered expression have been described previously.^{28,30} Patient 8 had a 17p deletion in one allele in 43% of peripheral blood lymphocytes, patient 41 had a 17p deletion in one allele in 94% of peripheral blood lymphocytes, and patient 40 had a frame-shift mutation in one allele (nucleotide deletion in codon 272) and a 17p deletion in the other allele in 86% of peripheral blood lymphocytes. First, we incubated these CLL cells with 5 μ M Akti-1/2 or 0.5 μ M A-443654 for 24 h. Interestingly, we observed a decrease in viability in two of the three samples with Akti-1/2 treatment and in all three samples with A-443654 treatment (Figure 6A).

Western blot analysis revealed an increase in NOXA levels in the three samples when treated with both inhibitors, while PUMA levels increased in only one sample (patient 8) with 5 μ M Akti-1/2 treatment. MCL-1 levels decreased with Akti-1/2 in patients 8 and 41, where Akti-1/2 induced apoptosis. In patient 40, MCL-1 levels increased with Akti-1/2 treatment, and the inhibitor did not induce apoptosis. A-443654 treatment induced a decrease in MCL-1 levels in the three samples (Figure 6A). As a control of *TP53* status we used 5 μ M Nutlin-3a, which has been described to induce apoptosis and p53 accumulation in cells with wild-type *TP53* but not in those with deleted/mutated *TP53*.²⁸

Next, we examined the apoptosis mRNA expression profile by performing RT-MLPA. Incubation with 5 μ M Akti-1/2 or 0.5 μ M A-443654 induced almost the same mRNA expression profile as that in CLL cells with the wild-type *TP53*, except that *PUMA* mRNA

levels did not increase after treatment with A-443654 (Figure 6B).

Discussion

In this study we investigated the effect of two Akt inhibitors on the viability of CLL cells. Both Akt inhibitors induced apoptosis in primary CLL cells. These results are in agreement with a recent report describing that introduction of constitutively active myr.Akt increases the viability of CLL cells.³¹

The mechanism of action of the two Akt inhibitors is somewhat different (*Online Supplementary Figure S9*). Surprisingly, Akti-1/2 inhibits Akt but does not induce changes in the RT-MLPA profile. Akt modulates the transcriptional activity of at least one transcription factor, FoxO3a,¹⁵ which would induce changes in the mRNA levels of its transcriptional targets *BIM*³² and *PUMA*.³³ However, RT-MLPA experiments suggest that dephosphorylation of FoxO3a induced by Akti-1/2 is not sufficient to induce the transcription of *BIM* and *PUMA* in CLL cells. As A-443654 is a less specific Akt-inhibitor,²¹ the simplest model would be to consider that inhibition of Akt (common to both inhibitors) does not induce changes in the RT-MLPA profile, and that A-443654 has additional targets to explain its effects on the expression of genes. Thus, A-443654 induces an increase in the levels of p53 protein and the induction of *PUMA* mRNA, a transcriptional target of *TP53* in CLL.^{29,34} In agreement with these data, the induction of *PUMA* mRNA by A-443654 was decreased in CLL cells with deleted/mutated *TP53*. Interestingly, Akti-1/2 induced *PUMA* and *NOXA* proteins without affecting *PUMA* and *NOXA* mRNA. The mechanism for this effect is unknown and could be explained by increased translation or decreased proteolysis of these proteins.

A common effect of both Akt inhibitors is the modulation of NOXA/MCL-1 balance. It has been reported that in primary CLL cells, the majority of NOXA protein is associated with MCL-1.³⁵

Thus, Akti-1/2 and A-443654 treatment induced an increase in NOXA protein levels and a down-regulation of the levels of MCL-1, a critical survival protein in CLL cells. Furthermore, inhibition of caspases prevents the down-regulation of MCL-1 induced by Akti-1/2, suggesting that MCL-1 cleavage participates in an amplification loop that increases cytochrome c release and apoptosis in CLL cells, as described for PKC inhibitors.³⁶ In agreement with our results, the introduction of constitutively active myr.Akt increases MCL-1 protein, and inhibition of MCL-1 by treatment with siRNA induces apoptosis in CLL.³¹ The mechanism of regulation of MCL-1 protein by Akt in CLL cells is unknown. The Akt substrate GSK-3 has been reported to induce destabilization of MCL-1 protein.¹⁶ However, inhibition of GSK-3 does not inhibit the apoptotic effect of PI3K inhibitors.⁷ As GSK-3 is inhibited by PKC,³⁷ perhaps the over-expression of active PKC- β II³⁸ blocks this pathway in CLL cells.

We found that B cells from CLL samples were more

sensitive to Akt inhibitors than T cells from CLL samples, and B or T cells from healthy donors. Chemotherapeutic drugs, including fludarabine, chlorambucil, and doxorubicin induce apoptosis equally in both B and T cells, leading to immunosuppression.^{39,40} Thus, the differential effect of Akti-1/2 and A-443654 in B and T lymphocytes is of interest. In conclusion, the results presented here suggest that clinically suitable small-molecule inhibitors of Akt alone or in combination with chemotherapeutic drugs might be a new therapeutic option for the treatment of CLL.

Authorship and Disclosures

MdeF performed the research and contributed to data analysis and manuscript writing. DIS, AMC, LCM, AFS and DMGG performed the research and contributed with analytical tools. EdelaB contributed with patients' samples and data. GP designed the research and contributed to data analysis. JG designed the research and contributed to data analysis and manuscript writing. The authors reported no potential conflicts of interest.

References

- Barragan M, Campas C, Bellosillo B, Gil J. Protein kinases in the regulation of apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2003;44:1865-70.
- Barragan M, Bellosillo B, Campas C, Colomer D, Pons G, Gil J. Involvement of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in the survival of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2002;99:2969-76.
- Bernal A, Pastore RD, Asgary Z, Keller SA, Cesarman E, Liou HC, et al. Survival of leukemic B cells promoted by engagement of the antigen receptor. *Blood* 2001;98:3050-7.
- Ringshausen I, Schneller F, Bogner C, Hipp S, Duyster J, Peschel C, et al. Constitutively activated phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) is involved in the defect of apoptosis in B-CLL: association with protein kinase CA. *Blood* 2002;100:3741-8.
- Jones DT, Ganeshaguru K, Anderson RJ, Jackson TR, Bruckdorfer KR, Low SY, et al. Albumin activates the AKT signaling pathway and protects B-chronic lymphocytic leukemia cells from chlorambucil- and radiation-induced apoptosis. *Blood* 2003;101:3174-80.
- Cuni S, Perez-Aciego P, Perez-Chacon G, Vargas JA, Sanchez A, Martin-Saavedra FM, et al. A sustained activation of PI3K/NF-kappaB pathway is critical for the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia* 2004;18:1391-400.
- Plate JM. PI3-kinase regulates survival of chronic lymphocytic leukemia B-cells by preventing caspase 8 activation. *Leuk Lymphoma* 2004;45:1519-29.
- Nedellec S, Renaudineau Y, Bordron A, Berthou C, Porakishvili N, Lydyard PM, et al. B cell response to surface IgM cross-linking identifies different prognostic groups of B-chronic lymphocytic leukemia patients. *J Immunol* 2005;174: 3749-56.
- Hu X, Haney N, Kropp D, Kabore AF, Johnston JB, Gibson SB. Lysophosphatidic acid (LPA) protects primary chronic lymphocytic leukemia cells from apoptosis through LPA receptor activation of the anti-apoptotic protein AKT/PKB. *J Biol Chem* 2005;280: 9498-508.
- Barragan M, de Frias M, Iglesias-Serret D, Campas C, Castano E, Santidrian AF, et al. Regulation of Akt/PKB by phosphatidylinositol 3-kinase-dependent and -independent pathways in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells: role of protein kinase C β . *J Leukoc Biol* 2006;80: 1473-9.
- Petlickovski A, Laurenti L, Li X, Marietti S, Chiusolo P, Sica S, et al. Sustained signaling through the B-cell receptor induces Mcl-1 and promotes survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 2005; 105:4820-7.
- Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet* 2006;7:606-19.
- Leupin N, Cenni B, Novak U, Hugli B, Graber HU, Tobler A, et al. Disparate expression of the PTEN gene: a novel finding in B-cell chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL). *Br J Haematol* 2003;121:97-100.
- Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 2007;129:1261-74.
- 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;96:857-68.
- Maurer U, Charvet C, Wagman AS, Dejardin E, Green DR. Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1. *Mol Cell* 2006; 21:749-60.
- Longo PG, Laurenti L, Gobessi S, Petlickovski A, Pelosi M, Chiusolo P, et al. The Akt signaling pathway determines the different proliferative capacity of chronic lymphocytic leukemia B-cells from patients with progressive and stable disease. *Leukemia* 2007;21:110-20.
- Luo Y, Shoemaker AR, Liu X, Woods KW, Thomas SA, de Jong R, et al. Potent and selective inhibitors of Akt kinases slow the progress of tumors in vivo. *Mol Cancer Ther* 2005;4:977-86.
- Shi Y, Liu X, Han EK, Guan R, Shoemaker AR, Oleksiewicz A, et al. Optimal classes of chemotherapeutic agents sensitized by specific small-molecule inhibitors of akt in vitro and in vivo. *Neoplasia* 2005; 7:992-1000.
- Han EK, Levenson JD, McGonigal T, Shah OJ, Woods KW, Hunter T, et al. Akt inhibitor A-443654 induces rapid Akt Ser-473 phosphorylation independent of mTORC1 inhibition. *Oncogene* 2007;26:5655-61.
- Bain J, Plater L, Elliott M, Shpiro N, Hastie CJ, McLauchlan H, et al. The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J* 2007;408:297-315.
- Barnett SF, Defeo-Jones D, Fu S, Hancock PJ, Haskell KM, Jones RE, et al. Identification and characterization of pleckstrin-homology-domain-dependent and isoenzyme-specific Akt inhibitors. *Biochem J* 2005;385:399-408.
- Logie L, Ruiz-Alcaraz AJ, Keane M, Woods YL, Bain J, Marquez R, et al. Characterization of a protein kinase B inhibitor in vitro and in insulin-treated liver cells. *Diabetes* 2007;56: 2218-27.
- Bellosillo B, Pique M, Barragan M, Castano E, Villamor N, Colomer D, et al. Aspirin and salicylate induce apoptosis and activation of caspases in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 1998;92:1406-14.
- Eldering E, Spek CA, Aberson HL, Grummels A, Derks IA, de Vos AF, et al. Expression profiling via novel multiplex assay allows rapid assessment of gene regulation in defined signalling pathways. *Nucleic Acids Res* 2003;31:e153.
- Dancescu M, Rubio-Trujillo M, Biron G, Bron D, Delespesse G, Sarfati M. Interleukin 4 protects chronic lymphocytic leukemic B cells from death by apoptosis and upregulates Bcl-2 expression. *J Exp Med* 1992;176:1319-26.
- Burger JA, Tsukada N, Burger M, Zvaifler NJ, Dell'Aquila M, Kipps TJ. Blood-derived nurse-like cells pro-

- nect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood* 2000;96:2655-63.
28. Coll-Mulet L, Iglesias-Serret D, Santidrian AF, Cosialls AM, de Frias M, Castano E, et al. MDM2 antagonists activate p53 and synergize with genotoxic drugs in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2006;107:4109-14.
 29. Coll-Mulet L, Santidrian AF, Cosialls AM, Iglesias-Serret D, de Frias M, Grau J, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification for detection of genomic alterations in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2008;142:793-801.
 30. Santidrian AF, Cosialls AM, Coll-Mulet L, Iglesias-Serret D, de Frias M, Gonzalez-Girones DM, et al. The potential anticancer agent PK11195 induces apoptosis irrespective of p53 and ATM status in chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica* 2007;92:1631-8.
 31. Longo PG, Laurenti L, Gobessi S, Sica S, Leone G, Efremov DG. The Akt/Mcl-1 pathway plays a prominent role in mediating antiapoptotic signals downstream of the B-cell receptor in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 2008;111:846-55.
 32. 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;10:1201-4.
 33. You H, Pellegrini M, Tsuchihara K, Yamamoto K, Hacker G, Erlacher M, et al. FOXO3a-dependent regulation of Puma in response to cytokine/growth factor withdrawal. *J Exp Med* 2006;203:1657-63.
 34. Mackus WJ, Kater AP, Grummels A, Evers LM, Hooijbrink B, Kramer MH, et al. Chronic lymphocytic leukemia cells display p53-dependent drug-induced Puma upregulation. *Leukemia* 2005;19:427-34.
 35. Hallaert DY, Spijker R, Jak M, Derks IA, Alves NL, Wensveen FM, et al. Crosstalk among Bcl-2 family members in B-CLL: seliciclib acts via the Mcl-1/Noxa axis and gradual exhaustion of Bcl-2 protection. *Cell Death Differ* 2007;14:1958-67.
 36. Snowden RT, Sun XM, Dyer MJ, Cohen GM. Bisindolylmaleimide IX is a potent inducer of apoptosis in chronic lymphocytic leukaemic cells and activates cleavage of Mcl-1. *Leukemia* 2003;17:1981-9.
 37. Christian SL, Sims PV, Gold MR. The B cell antigen receptor regulates the transcriptional activator β -catenin via protein kinase C-mediated inhibition of glycogen synthase kinase-3. *J Immunol* 2002;169:758-69.
 38. Abrams ST, Lakum T, Lin K, Jones GM, Treweeke AT, Farahani M, et al. B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia cells is regulated by overexpressed active protein kinase C β II. *Blood* 2007;109:1193-201.
 39. Keating MJ. Immunosuppression with purine analogues – the flip side of the gold coin. *Ann Oncol* 1993;4:347-8.
 40. Hamblin AD, Hamblin TJ. The immunodeficiency of chronic lymphocytic leukaemia. *Br Med Bull* 2008;87:49-62.

Preclinical Therapy

In vitro and In vivo Selective Antitumor Activity of Edelfosine against Mantle Cell Lymphoma and Chronic Lymphocytic Leukemia Involving Lipid Rafts

Faustino Mollinedo¹, Janis de la Iglesia-Vicente¹, Consuelo Gajate^{1,2}, Ander Estella-Hermoso de Mendoza³, Janny A. Villa-Pulgarin¹, Mercè de Frias⁵, Gaël Roué⁶, Joan Gil⁵, Dolors Colomer⁶, Miguel A. Campanero⁴, and María J. Blanco-Prieto³

Abstract

Purpose: Mantle cell lymphoma (MCL) and chronic lymphocytic leukemia (CLL) remain B-cell malignancies with limited therapeutic options. The present study investigates the *in vitro* and *in vivo* effect of the phospholipid ether edelfosine (1-*O*-octadecyl-2-*O*-methyl-*rac*-glycero-3-phosphocholine) in MCL and CLL.

Experimental Design: Several cell lines, patient-derived tumor cells, and xenografts in severe combined immunodeficient mice were used to examine the anti-MCL and anti-CLL activity of edelfosine. Furthermore, we analyzed the mechanism of action and drug biodistribution of edelfosine in MCL and CLL tumor-bearing severe combined immunodeficient mice.

Results: Here, we have found that the phospholipid ether edelfosine was the most potent alkyllysophospholipid analogue in killing MCL and CLL cells, including patient-derived primary cells, while sparing normal resting lymphocytes. Alkyllysophospholipid analogues ranked edelfosine > perifosine >> erucylphosphocholine ≥ miltefosine in their capacity to elicit apoptosis in MCL and CLL cells. Edelfosine induced coclustering of Fas/CD95 death receptor and rafts in MCL and CLL cells. Edelfosine was taken up by malignant cells, whereas normal resting lymphocytes hardly incorporated the drug. Raft disruption by cholesterol depletion inhibited drug uptake, Fas/CD95 clustering, and edelfosine-induced apoptosis. Edelfosine oral administration showed a potent *in vivo* anticancer activity in MCL and CLL xenograft mouse models, and the drug accumulated dramatically and preferentially in the tumor.

Conclusions: Our data indicate that edelfosine accumulates and kills MCL and CLL cells in a rather selective way, and set coclustering of Fas/CD95 and lipid rafts as a new framework in MCL and CLL therapy. Our data support a selective antitumor action of edelfosine. *Clin Cancer Res*; 16(7); OF1-9. ©2010 AACR.

Authors' Affiliations: ¹Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, Centro de Investigación del Cáncer, Consejo Superior de Investigaciones Científicas–Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno; ²Unidad de Investigación, Hospital Universitario de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, Salamanca, Spain; ³Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Navarra; ⁴Servicio de Farmacología Clínica, Clínica Universitaria, Pamplona, Spain; ⁵Departament de Ciències Fisiològiques II, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge–Universitat de Barcelona, L'Hospitalet de Llobregat, Spain; and ⁶Unitat d'Hematopatologia, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer–Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

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

Corresponding Author: Faustino Mollinedo, Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, Centro de Investigación del Cáncer, Consejo Superior de Investigaciones Científicas–Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, E-37007 Salamanca, Spain. Phone: 34-923-294806; Fax: 34-923-294795; E-mail: fmollin@usal.es or Consuelo Gajate, Unidad de Investigación, Hospital Universitario de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, E-37007 Salamanca, Spain. E-mail: cgajate@usal.es.

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2456

©2010 American Association for Cancer Research.

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) and mantle cell lymphoma (MCL) are two major B-cell–derived neoplasias for which current therapy is not satisfactory, leading in most cases to relapse and eventually to a fatal outcome. This lack of efficient therapy underscores the need for a continued search for novel chemotherapeutic agents. CLL is the most common adult leukemia and is characterized by the progressive accumulation of mature CD5⁺ B lymphocytes in the peripheral blood, bone marrow, and secondary lymphoid organs. New treatment combinations have incorporated the use of purine analogue (fludarabine)–based regimens together with monoclonal antibodies rituximab (anti-CD20) and alemtuzumab (anti-CD52), leading to improved complete response rates and prolonged progression-free survival, but a long-term survival benefit has not been shown (1, 2). MCL is characterized by the chromosomal translocation t(11;14)(q13;q32), resulting in the overexpression of cyclin D1 in mature B

Translational Relevance

Mantle cell lymphoma (MCL) and chronic lymphocytic leukemia (CLL) lack effective therapy. Synthetic alkyl-lysophospholipid analogues constitute a family of promising anticancer drugs, including miltefosine, perifosine, edelfosine, and erucylphosphocholine, which promote apoptosis in a variety of tumor cells. Here, we have found that edelfosine behaves as the most potent alkyl-lysophospholipid analogue in inducing cell death in MCL and CLL cells through coclustering of Fas/CD95 and rafts. Edelfosine induced a higher apoptotic response than perifosine in MCL and CLL patient-derived cells. Oral administration of edelfosine showed a strong *in vivo* anti-MCL and anti-CLL activity in xenograft mouse models. The drug accumulated in a dramatic and preferential way in the tumor, leading to drastic tumor regression. Our data reported here show a rather selective action of edelfosine against tumor cells and provide the proof of principle and rationale for further clinical evaluation of edelfosine to improve patient outcome in MCL and CLL.

lymphocytes that have a striking tendency to disseminate throughout the body (3). MCL is an aggressive lymphoma with a poor survival outcome and a median survival time of 3.5 years. Conventional chemotherapeutic regimens have been the standard treatment of MCL until the recent incorporation of rituximab, which increases overall survival as well as the response rate and duration. The introduction of stem cell transplantation improves survival, although this therapeutic modality is only applied to younger and fit patients (4). Currently, allogeneic bone marrow transplantation represents the only therapy with the potential for a curative approach, although it is associated with a high rate of complications (4). Therefore, development of novel therapeutic strategies is urgently needed to improve survival in patients with the above B-cell malignancies. In the last years, new strategies have been developed that target crucial cellular pathways, and proteasome inhibition with bortezomib has recently been approved in relapsed/refractory MCL (5). MCL and CLL cells share a relatively low proliferative index and a poor apoptotic rate (6, 7), and therefore, the transforming event is likely a failure in death regulation rather than a loss of growth control. This implies that a therapeutic potential for these diseases may lie in potentiating apoptosis.

Synthetic alkyl-lysophospholipid (ALP) analogues constitute a family of promising anticancer drugs, including edelfosine, miltefosine, perifosine, and erucylphosphocholine, which act at the cell membrane level (8–12). The phospholipid ether edelfosine (1-O-octadecyl-2-O-methyl-*rac*-glycero-3-phosphocholine, ET-18-OCH₃), considered the ALP prototype, induces selectively apoptosis in tumor cells (13) by recruiting Fas/CD95 death receptor in

membrane raft clusters (13–18). Edelfosine was the first antitumor agent shown to act through lipid rafts (15), and these membrane domains have been recently involved in the chemotherapeutic action of some additional antitumor agents (17, 19–23). Lipid rafts are membrane microdomains highly enriched in cholesterol and sphingolipids, and the proteins located in these microdomains are limited in their ability to freely diffuse over the plasma membrane, affecting protein function (24). Recent findings suggest that lipid rafts act as scaffolds, where Fas/CD95 and downstream signaling molecules are recruited to trigger apoptosis (16–18, 21, 25).

On these grounds, we hypothesized that MCL and CLL, showing a defective cell death control, could be considered stark examples for the particular proapoptotic features of ALPs. Thus, we addressed the possibility that these B-cell malignancies could be treated by these agents, and examined the putative involvement of lipid rafts in their antitumor action against MCL and CLL.

Materials and Methods

Drugs. Edelfosine was from Inkeysa and Apointech. Miltefosine was from Calbiochem. Perifosine and erucylphosphocholine were from Zentaris.

Cell lines and primary cells. Detailed information on the cell culture conditions for human MCL (JVM-2 and Z-138) and CLL (EHEB) cell lines and primary cells from CLL and MCL patients is included in Supplementary Data.

Apoptosis assay. Quantitation of apoptotic cells was determined by flow cytometry as the percentage of cells in the sub-G₁ region (hypodiploidy) in cell cycle analysis as previously described (26).

To analyze apoptosis in CLL/MCL patient-derived samples, 5×10^5 cells were incubated for 48 h with the indicated agents. Cells were then washed in Annexin-binding buffer and incubated in 50 μ L Annexin-binding buffer with allophycocyanin-conjugated anti-CD3 and phycoerythrin-conjugated anti-CD19 antibodies from Becton Dickinson for 10 min in the dark. Cells were then diluted with Annexin-binding buffer to a volume of 150 μ L and incubated with 1 μ L FITC-labeled Annexin V (Bender MedSystems) for 15 min in the dark. A total of 10,000 stained cells were then analyzed by flow cytometry on a FACSCalibur flow cytometer using CellQuest software (Becton Dickinson).

Western blot. Proteins (50 μ g) were separated on 12% SDS-PAGE and transferred onto Immobilon-P membranes (Millipore). Membranes were probed with anti-cyclin D1 (DCS-6, Cell Signaling Technology) and anti- β -actin (Sigma) antibodies. Antibody binding was detected using the enhanced chemiluminescence detection system (Amersham).

Confocal microscopy. Cells were settled onto poly-L-lysine-coated slides and analyzed with a Zeiss LSM 510 laser scan confocal microscope for membrane raft and Fas/CD95 visualization using FITC-labeled cholera toxin B subunit (Sigma) and anti-human Fas/CD95 SM1/1 IgG2a mouse monoclonal antibody (Bender MedSystems)

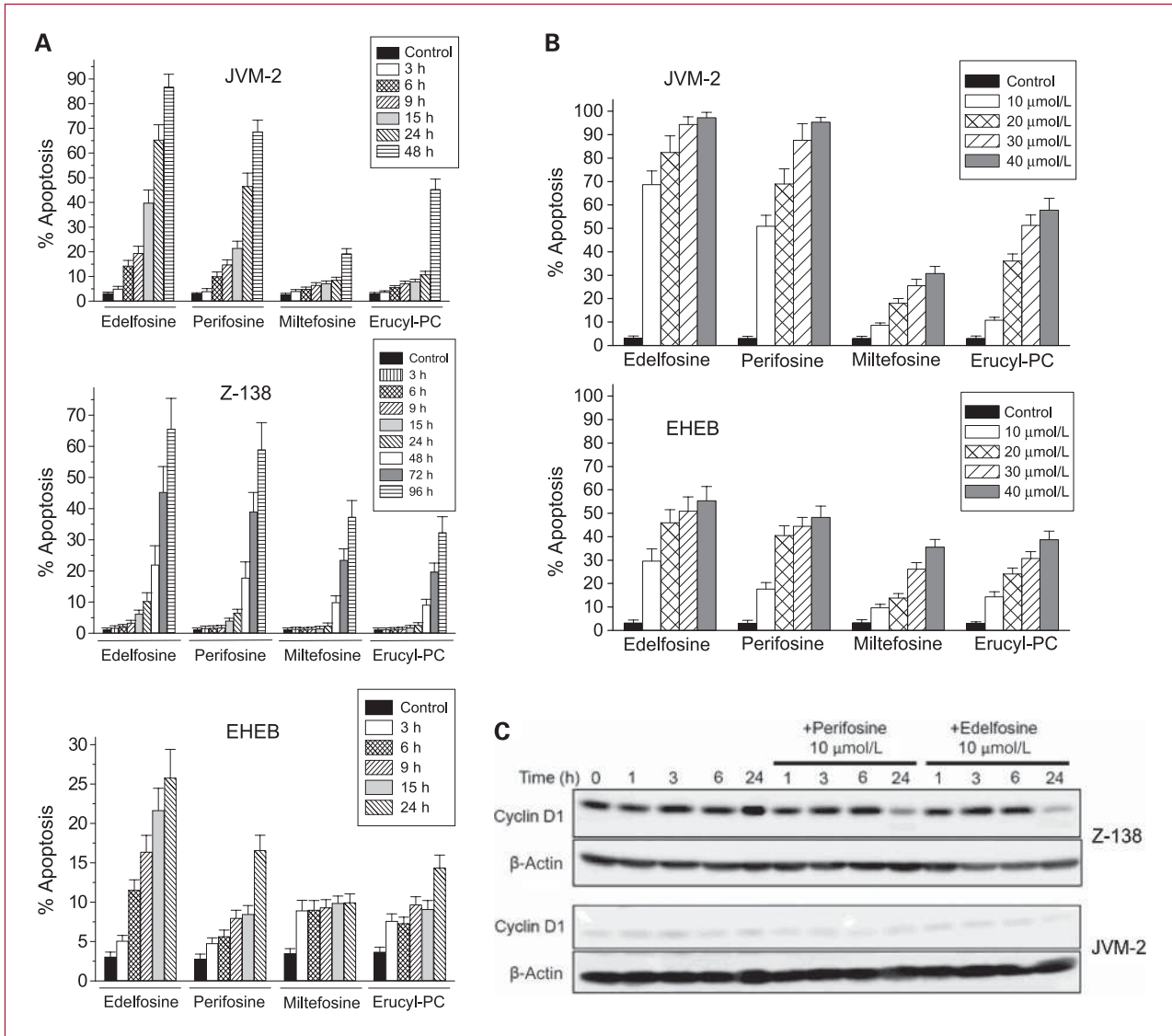


Fig. 1. Induction of apoptosis in MCL and CLL cells by ALPs. MCL (JVM-2 and Z-138) and CLL (EHEB) cell lines were incubated for the indicated times with 10 $\mu\text{mol/L}$ of the distinct ALPs edelfosine, perifosine, miltefosine, and erucylphosphocholine (Erucyl-PC; A) or for 24 h with different concentrations of the ALPs (B). Apoptosis was then quantitated as percentage of cells in the sub- G_1 region by flow cytometry. Untreated control cells were run in parallel. Data are means \pm SE of four independent determinations. C, cells were untreated or treated with 10 $\mu\text{mol/L}$ perifosine or edelfosine for the indicated times and analyzed by Western blot with anti-cyclin D1 and anti- β -actin antibodies. Immunoblotting of β -actin was used as an internal control for equal protein loading in each lane. Blots are representative of three experiments done.

followed by CY3-conjugated anti-mouse antibody (Pharmacia), as described (15). Colocalization assays were analyzed by excitation of both fluorochromes in the same section. Negative controls, lacking the primary antibody or using an irrelevant antibody, showed no staining.

Edelfosine uptake. Drug uptake was measured as described previously (13) after incubating 10^6 cells with 10 nmol [^3H]edelfosine for 2 h in RPMI 1640/10% fetal bovine serum and subsequent exhaustive washing (six times) with PBS + 2% bovine serum albumin to eliminate the loosely cell surface-bound ether lipid. [^3H]edelfosine (specific activity, 42 Ci/mmol) was synthesized by

tritiation of the 9-octadecenyl derivative (Amersham Buchler).

Cholesterol depletion. Cells ($2.5 \times 10^5/\text{mL}$) were pre-treated with 2.5 mg/mL methyl- β -cyclodextrin (MCD) for 30 min at 37°C in serum-free medium. Cells were then washed thrice and resuspended in complete culture medium before edelfosine addition.

Xenograft mouse model. CB17-severe combined immunodeficient (SCID) mice (Charles River Laboratories), kept and handled according to institutional guidelines, complying with Spanish legislation under a 12/12-h light/dark cycle at a temperature of 22°C, received a standard diet

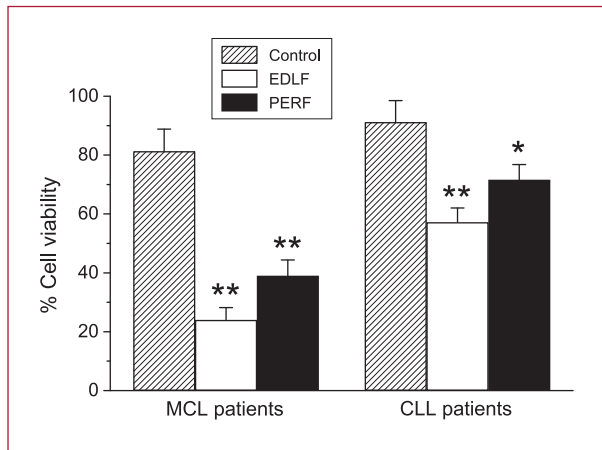


Fig. 2. Edelfosine and perifosine kill patient-derived MCL and CLL cells. Primary malignant cells isolated from MCL and CLL patients were incubated for 48 h in the absence (control) or in the presence of 10 $\mu\text{mol/L}$ edelfosine (EDLF) or perifosine (PERF), and then cell viability was assessed as nonapoptotic cells in Annexin V analysis by flow cytometry. Data are means \pm SE of 7 (MCL) or 10 (CLL) independent patients. Asterisks indicate that cell viability in edelfosine- and perifosine-treated cells is significantly different from untreated control cells at $P < 0.05$ (*) and $P < 0.01$ (**) levels by Student's *t* test.

and acidified water *ad libitum*. CB17-SCID mice were inoculated s.c. into their lower dorsum with 10^7 Z-138 or EHEB cells in 100 μL PBS and 100 μL Matrigel basement membrane matrix (Becton Dickinson). When tumors were palpable, mice were randomly assigned into cohorts of 8 to 10 mice each, receiving a daily oral administration of edelfosine (30 mg/kg) or an equal volume of vehicle (PBS). The shortest and longest diameter of the tumor were measured with calipers at 2- to 5-d intervals, and tumor volume (mm^3) was calculated using the following standard formula: (the shortest diameter)² \times (the longest diameter) \times 0.5. Animals were sacrificed, according to institutional guidelines, when the diameter of their tumors reached 3 cm or when significant toxicity was observed. Animal body weight and any sign of morbidity were monitored. Drug treatment lasted for 21 d (MCL) and 34 d (CLL), and mice were killed 24 h after the last drug administration. Then, tumor xenografts were extirpated, measured, and weighed, and a necropsy analysis involving tumors and distinct organs was carried out.

Plasma/tissue extraction procedure for edelfosine biodistribution studies. MCL- or CLL-bearing SCID mice were treated with a daily oral administration of edelfosine (30 mg/kg) for 21 d (MCL) or 34 d (CLL). Twenty-four hours after the last drug oral administration, blood was collected in EDTA surface-coated tubes and then centrifuged at $2,000 \times g$ for 15 min (4°C) to collect plasma (100 μL). Then, animals were sacrificed, and distinct organs and tumors were collected and weighed. Tissues and tumors were homogenized in 1-mL PBS (pH 7.4) using a Mini-bead Beater (BioSpect Products, Inc.) and centrifuged at $10,000 \times g$ for 10 min. Both plasma and tissue supernatants

were collected and stored at -80°C until high-performance liquid chromatography–mass spectrometry (HPLC-MS) analysis was done. Ten micrograms of platelet-activating factor (1 mg/mL), used as internal standard, were added onto 100 μL of plasma or tissue/tumor supernatant. A mixture (190 μL) of 1% formic acid/methanol was added to precipitate proteins. Samples were vortexed for 1 min, and after centrifugation ($20,000 \times g$, 10 min), 25 μL of the supernatant were analyzed by HPLC-MS.

Quantitative determination of edelfosine by HPLC-MS analysis. The technique used was a slight modification of a previously described method (27) and is described in detail in Supplementary Data.

Statistical analysis. All values are expressed as means \pm SE. Between-group statistical differences were assessed using the Mann-Whitney test or the Student's *t* test. A *P* value of <0.05 was considered statistically significant.

Results

Edelfosine is the most potent ALP inducing apoptosis in MCL and CLL cells. We have previously found that the ALP edelfosine is effective in inducing apoptosis in several leukemic cells through the aggregation of Fas/CD95 in clustered rafts (14–18). Following time course (Fig. 1A) and dose-response (Fig. 1B) experiments, we found that that ALPs ranked edelfosine $>$ perifosine $>$ erucylphosphocholine \geq miltefosine for their capacity to promote apoptosis, assessed as the percentage of cells in the sub- G_1 region (28), in MCL (JVM-2 and Z-138) and CLL (EHEB) cell lines. Because MCL is characterized by cyclin D1 overexpression, we analyzed cyclin D1 levels by Western blot in Z-138 and JVM-2 cells exposed for 1 to 24 hours to 10 $\mu\text{mol/L}$

Table 1. Selective killing of patient-derived CLL cells by edelfosine, sparing normal cells

Treatment	% Cell viability	
	CD19 ⁺ CLL cells	CD3 ⁺ T cells
Edelfosine (10 $\mu\text{mol/L}$)	60.3 \pm 5.6	97.8 \pm 1.9
Edelfosine (20 $\mu\text{mol/L}$)	43.7 \pm 4.9	86.5 \pm 3.2
Perifosine (10 $\mu\text{mol/L}$)	73.1 \pm 4.8	98.4 \pm 1.5
Perifosine (20 $\mu\text{mol/L}$)	61.0 \pm 3.7	90.9 \pm 2.8
Staurosporine (0.5 $\mu\text{mol/L}$)	17.8 \pm 6.7	22.5 \pm 7.5

NOTE: Primary lymphocyte cultures from CLL patients were incubated with edelfosine or perifosine for 48 h at the indicated concentrations. Staurosporine was used as a positive control of apoptosis. Percentage of cell viability was measured as nonapoptotic CD3⁺/CD19⁻ T cells or CD3⁻/CD19⁺ B cells from CLL samples in Annexin V analysis by flow cytometry. Untreated control CD19⁺ and CD3⁺ cells were run in parallel and showed a cell viability of $>93\%$ and $>98\%$, respectively. Data are shown as mean values \pm SE of five independent CLL patients.

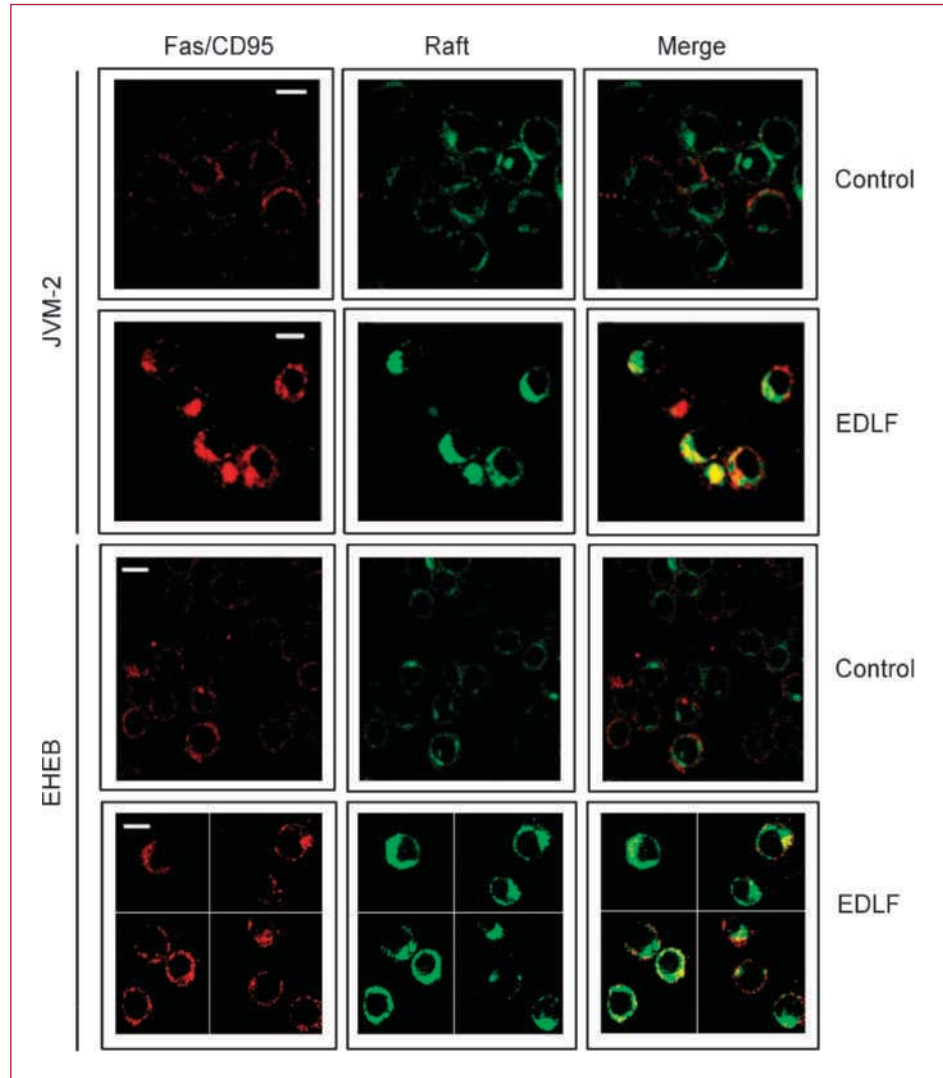


Fig. 3. Edelfosine-induced coclustering of Fas/CD95 and rafts in MCL and CLL cells. JVM-2 and EHEB cells were either untreated (Control) or treated with 10 $\mu\text{mol/L}$ edelfosine for 9 h and then stained with FITC-labeled cholera toxin B subunit to identify lipid rafts (green fluorescence) and with a specific anti-Fas/CD95 monoclonal antibody followed by CY3-conjugated anti-mouse Ig antibody (red fluorescence). Areas of colocalization between membrane rafts and Fas/CD95 in the merge panels are yellow. Images shown are representative of four independent experiments. Scale bars, 10 μm .

perifosine or edelfosine. As shown in Fig. 1C, we found only a decrease in cyclin D1 protein level in Z-138 cells after 24-hour treatment. However, we detected the cleavage of the typical caspase-3 substrate poly(ADP-ribose) polymerase, as a marker for apoptosis onset, by 6-hour treatment in edelfosine- and perifosine-treated Z-138 and JVM-2 cells (data not shown), whereas cyclin D1 protein level remained unaffected (Fig. 1C). It is noteworthy that despite the presence of t(11;14) in both JVM-2 and Z-138 cell lines, JVM-2 cells harbored a reduced basal cyclin D1 content when compared with Z-138, as assessed by protein and mRNA levels (Fig. 1C; data not shown). Thus, these results suggest that cyclin D1 modulation is not involved in edelfosine/perifosine antitumor activity in MCL cell lines and that the decrease in cyclin D1 protein level detected at 24 hours (Fig. 1C) was a consequence rather than a cause in edelfosine- and perifosine-induced apoptosis.

Edelfosine was also more active than perifosine against primary malignant cells derived from MCL and CLL

patients (Fig. 2). Following a dose-response analysis, we found that edelfosine was significantly more cytotoxic ($P < 0.05$) than perifosine against primary CD19⁺ CLL cells derived from patients, whereas normal resting CD3⁺-T lymphocytes from the same patients remained rather resistant (Table 1). This selective action of both edelfosine and perifosine was highlighted when compared with staurosporine that induced apoptosis in both malignant and normal cells at a similar rate (Table 1).

Edelfosine-induced apoptosis in MCL and CLL cells is mediated by lipid rafts. By using the raft marker FITC-labeled cholera toxin B subunit that binds ganglioside G_{M1} (29), mainly found in rafts (30), we found that 10 $\mu\text{mol/L}$ edelfosine induced coclustering of lipid rafts and Fas/CD95 in both JVM-2 and EHEB cells (Fig. 3). Furthermore, we found that MCL (JVM-2 and Z-138) and CLL (EHEB) cell lines took up high amounts of edelfosine (Fig. 4A), whereas normal resting lymphocytes incorporated negligible amounts of drug (<20 pmol/10⁶ cells after

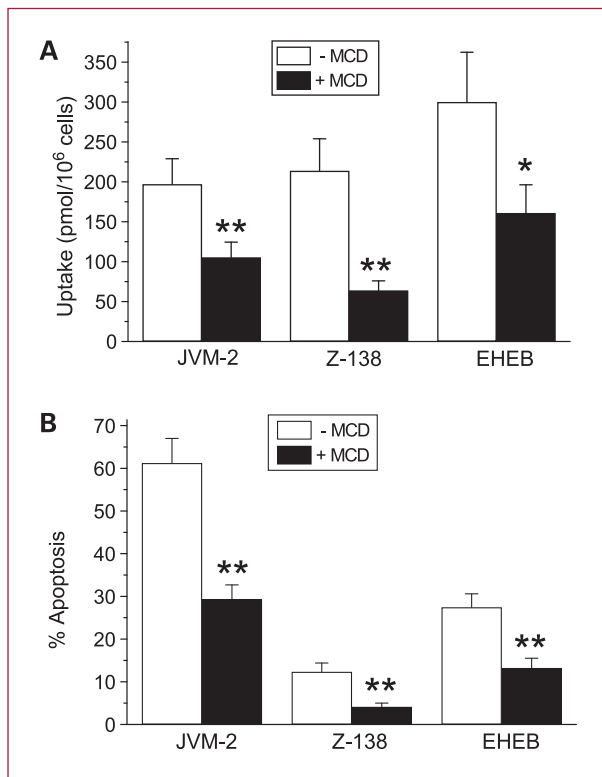


Fig. 4. Raft involvement in edelfosine uptake and edelfosine-induced apoptosis. A, JVM-2, Z-138, and EHEB cells, untreated or pretreated with 2.5 mg/mL MCD for 30 min, were incubated with 10 nmol [³H] edelfosine (0.1 μ Ci) for 2 h, and then drug uptake was determined. B, JVM-2, Z-138, and EHEB cells, untreated or pretreated with 2.5 mg/mL MCD for 30 min, were incubated with 10 μ M edelfosine for 24 h, and then apoptosis was assessed by flow cytometry as the percentage of hypodiploid (sub-G₁) cells. Data are means \pm SE of four independent determinations. Asterisks indicate values that are significantly different from the corresponding MCD-untreated cells at $P < 0.05$ (*) and $P < 0.01$ (**) levels by Student's *t* test.

2 h of incubation with 10 nmol [³H]edelfosine). Lipid raft disruption by MCD treatment inhibited drug uptake (Fig. 4A), edelfosine-induced apoptosis (Fig. 4B), as well as Fas/CD95 clustering (data not shown). These data suggest that lipid rafts are essential for edelfosine uptake and edelfosine-induced apoptosis in MCL and CLL cells.

Edelfosine accumulates in MCL and CLL tumors and inhibits human MCL and CLL cell growth in vivo. We next determined whether edelfosine showed *in vivo* anti-human MCL and CLL cell activity. CB17-SCID mice were inoculated with 10⁷ Z-138 or EHEB cells for MCL or CLL xenograft animal models. The MCL animal model developed aggressive tumors that were tangible within 1 week of inoculation, and increased rapidly in a few weeks time (Fig. 5A), whereas CLL tumors grew more slowly (Fig. 5A). Following the development of a palpable tumor, mice were randomized into drug-treated (30 mg/kg edelfosine, daily oral administration) and control (PBS vehicle) groups. Caliper measurements were done every 2 to 5 days to calculate tumor volume (Fig. 5A). Oral administration of

edelfosine achieved significant MCL and CLL tumor regression (Fig. 5A-C). When tumor size reached \sim 10% of body weight, animals were killed for ethical reasons. This size was approximately reached by day 15 in some of the MCL tumor-bearing mice (Fig. 5A), but this animal model was extended 1 week more to obtain reliable and comparable data with drug-treated animals in which tumor size was decreased by that time (Fig. 5A). A comparison of tumors isolated from untreated control and drug-treated MCL- and CLL-bearing mice, at the end of treatment, rendered a remarkable anti-MCL and anti-CLL activity of edelfosine, with a reduction of $>$ 85% in tumor weight and volume in both MCL and CLL animal models (Fig. 5B). Organ examination at necropsy did not reveal any apparent toxicity (data not shown), and there was an evident difference between the highly vascularized tumors from drug-free mice and the pale poorly vascularized tumors from edelfosine-treated mice (Fig. 5C). In addition, MCL tumors were bulky in drug-free mice but resulted rather flat after edelfosine treatment (Fig. 5C). No significant differences in mean body weight were observed between drug-treated and control animals during the *in vivo* assay (3-5% of body weight loss in the treated groups versus control groups). A drug biodistribution study showed that edelfosine dramatically accumulated in the MCL and CLL tumors (Fig. 5D). Tumor/plasma concentration ratio of edelfosine in the tumor was significantly higher than that detected in both kidney and liver after completion of the experiment in MCL and CLL animal models (Fig. 5D), with a drug mean concentration in plasma of 5.64 μ g/mL. In the CLL animal model, we examined the content of edelfosine in a wide variety of distinct organs and found that the drug was dramatically accumulated in the tumor compared with lung, heart, spleen, liver, intestine, or kidney (Fig. 5D). Taken together, our data indicate a preferential accumulation of edelfosine in the tumor.

Discussion

The data reported here show that edelfosine behaves as the most potent ALP in killing MCL and CLL cells via a raft-mediated process. Our data indicate that edelfosine is a powerful antitumor agent against MCL and CLL as assessed by *in vitro*, *ex vivo*, and *in vivo* evidences. In addition, we found a rather selective and dramatic accumulation of edelfosine in MCL and CLL tumor cells in animal models.

Here, we found that edelfosine induces the recruitment of Fas/CD95 death receptor in raft aggregates in MCL and CLL cells. Raft disruption by cholesterol depletion in MCL and CLL cells inhibited both edelfosine uptake and drug-induced apoptosis, as well as Fas/CD95 clustering, thus suggesting a major role of rafts in the uptake and antitumor action of edelfosine. Previous reports have shown that MCL and CLL cells express Fas/CD95, but a deficient apoptotic response to the external stimulation of Fas/CD95 by agonistic anti-Fas/CD95 antibodies was reported (7, 31). Unlike the natural ligand FasL/CD95L or agonistic anti-Fas/CD95 antibodies that act through their interaction with

the exogenous portion of the Fas/CD95 death receptor, edelfosine induces activation of Fas/CD95 from within the cell independently of its ligand (16, 32). We have previously found that edelfosine is even more efficient than FasL/CD95L in promoting programmed cell death through Fas/CD95 activation by its recruitment in membrane rafts enriched in downstream signaling molecules (14, 16–18, 25, 33). Thus, edelfosine might induce Fas/CD95 activation, although the receptor is not triggered by its natural ligand or agonistic antibodies.

Using distinct MCL and CLL xenograft mouse models, we found that edelfosine accumulates in high amounts in the tumor tissue and shows a remarkable antitumor activity, leading to dramatic tumor regression. In addition, we consistently found in the MCL and CLL xenograft

animal models that tumors became smaller and poorly vascularized. This could be in agreement with reports showing an antiangiogenic effect of edelfosine (34, 35). Thus, further insight into the effect of edelfosine on angiogenesis and how this action affects cancer development is warranted.

Following edelfosine oral administration in non-tumor-bearing SCID mice, we have recently found a rather wide drug distribution pattern to several tissues, including lung, spleen, intestine, liver, and kidney (36). In this study, we also found that edelfosine showed a preferential accumulation in the tumor in a MCL-bearing mouse animal model (36). Now, we have largely extended this initial study and analyzed the *in vivo* effect of edelfosine in MCL and CLL animal models. Interestingly, we found here that when

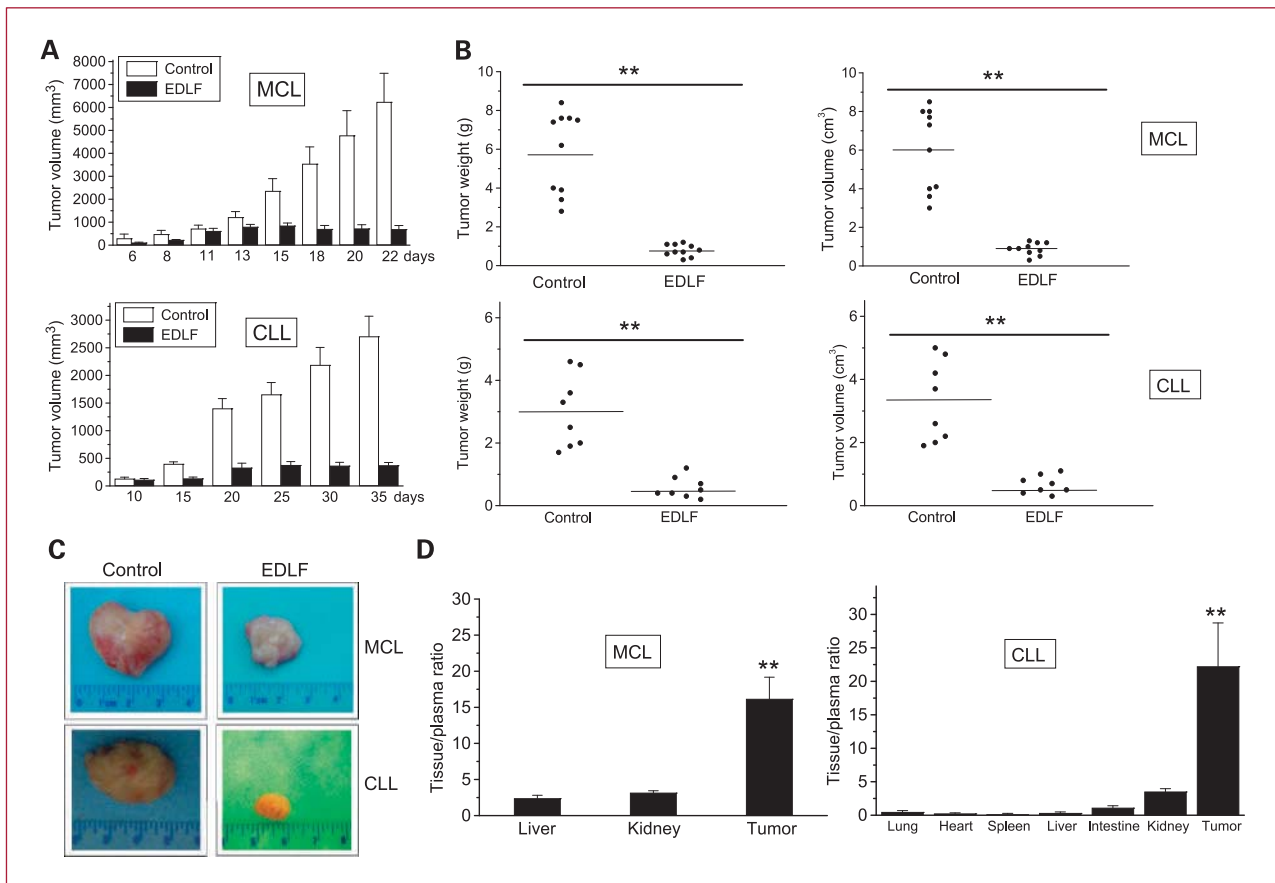


Fig. 5. Edelfosine inhibits human MCL and CLL cell growth *in vivo*. CB17-SCID mice were inoculated s.c. with 10^7 Z-138 or EHEB cells. Daily oral administration of edelfosine (30 mg/kg, $n = 10$ for MCL animal model and $n = 8$ for CLL animal model) started after the development of a palpable tumor. Tumor size was recorded every 2 to 5 d. A, edelfosine significantly ($P < 0.01$; from day 15 of treatment until the end of the experiment) inhibited MCL and CLL tumor growth compared with the control group treated with vehicle (PBS, $n = 10$ for MCL animal model and $n = 8$ for CLL animal model). Data are means \pm SE ($n = 10$, MCL; $n = 8$, CLL). B, after completion of the *in vivo* assay (22 d for MCL and 35 d for CLL), control and edelfosine-treated mice were sacrificed and tumors were measured in the distinct mice. The tumor size and weight values of each single animal (dots) and the average values of each experimental group (horizontal bars) are shown. Asterisks indicate that tumor weight and size values were significantly lower after edelfosine treatment, compared with control drug-free mice, at $P < 0.01$ (**). C, remarkable growth inhibition of MCL and CLL tumors was observed after edelfosine treatment (30 mg/kg). D, tissue/plasma concentration ratios, in liver, kidney, and tumor, of edelfosine after daily oral administration of edelfosine (30 mg/kg) for 3 wk in MCL-bearing SCID mice (mean \pm SE, $n = 5$), and tissue/plasma concentration ratios, in lung, heart, spleen, liver, intestine, kidney, and tumor, of edelfosine after daily oral administration of edelfosine (30 mg/kg) for 34 d in CLL-bearing SCID mice (mean \pm SE, $n = 5$). Asterisks indicate that the tumor/plasma ratio values are significantly different from the other tissue/plasma ratios at $P < 0.01$ (**).

SCID mice contained a MCL or CLL tumor, edelfosine distribution was dramatically and significantly shifted toward the tumor (tissue/plasma concentration ratios >16 ; $P < 0.01$), suggesting a preferential tumor location for edelfosine. Our herein reported *in vivo* data, together with our present and previous *in vitro* determinations in a wide number of malignant and normal cells (14, 16, 17), suggest a rather selective edelfosine uptake and cytotoxic action in tumor cells. The selective action of edelfosine on tumor cells supports its low toxicity. We did not find any apparent damage in the distinct organs analyzed following necropsy analysis in the *in vivo* studies reported here. Lack of toxicity of edelfosine in a rat model has been reported, including no significant cardiotoxicity, hepatotoxicity, or renal toxicity (37). Our biodistribution data in the murine models reported here showed a mean concentration of edelfosine in plasma of 5.64 $\mu\text{g/mL}$ (10.77 $\mu\text{mol/L}$; edelfosine molecular mass, 523.7). Thus, the herein reported *in vitro* effects, rendered by 10 $\mu\text{mol/L}$ edelfosine, were detected at a pharmacologically relevant drug concentration.

Our data constitute the first *in vitro* and *in vivo* evidence for the antitumor action of edelfosine in MCL and CLL, two hematologic malignancies with poor survival outcome. Taken together, the results reported here provide the proof of principle and rationale for further clinical evaluation of edelfosine to improve patient outcome in MCL and CLL. The results reported here also highlight the involvement of lipid rafts in the action of edelfosine on B-cell malignancies, such as MCL and CLL.

References

- Christian BA, Lin TS. Antibody therapy for chronic lymphocytic leukemia. *Semin Hematol* 2008;45:95–103.
- Montserrat E, Moreno C. Chronic lymphocytic leukaemia: a short overview. *Ann Oncol* 2008;19 Suppl 7:vii320–5.
- 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.
- Schmidt C, Dreyling M. Therapy of mantle cell lymphoma: current standards and future strategies. *Hematol Oncol Clin North Am* 2008;22:953–63.
- Leonard JP, Williams ME, Goy A, et al. Mantle cell lymphoma: biological insights and treatment advances. *Clin Lymphoma Myeloma* 2009;9:267–77.
- Rummel MJ, de Vos S, Hoelzer D, Koeffler HP, Hofmann WK. Altered apoptosis pathways in mantle cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2004;45:49–54.
- Proto-Siqueira R, Panepucci RA, Careta FP, et al. SAGE analysis demonstrates increased expression of TOSO contributing to Fas-mediated resistance in CLL. *Blood* 2008;112:394–7.
- Gajate C, Mollinedo F. Biological activities, mechanisms of action and biomedical prospect of the antitumor ether phospholipid ET-18-OCH₃ (edelfosine), a proapoptotic agent in tumor cells. *Curr Drug Metab* 2002;3:491–525.
- Jendrossek V, Handrick R. Membrane targeted anticancer drugs: potent inducers of apoptosis and putative radiosensitisers. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents* 2003;3:343–53.
- Mollinedo F, Gajate C, Martin-Santamaria S, Gago F. ET-18-OCH₃ (edelfosine): a selective antitumor lipid targeting apoptosis through intracellular activation of Fas/CD95 death receptor. *Curr Med Chem* 2004;11:3163–84.
- Vink SR, van Blitterswijk WJ, Schellens JH, Verheij M. Rationale and

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

We thank Alberto Gomez-Alonso, Javier Garcia-Criado, and Jose F. Martin-Martin for their help in the *in vivo* assays and for allowing us to use their animal facilities during part of this study.

Grant Support

Ministerio de Ciencia e Innovación grants SAF2005-04293, SAF2006-8850, SAF2007-61261, SAF2007-60964, PCT-090100-2007-27, PS09/01915, and SAF2008-02251; Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer grants RD06/0020/0014, RD06/0020/0097, and RD06/0020/1037 (Instituto de Salud Carlos III, cofunded by the Fondo Europeo de Desarrollo Regional of the European Union); Fondo de Investigación Sanitaria and European Commission grant FIS-FEDER 06/0813; Junta de Castilla y León (CS101A08, GR15-Experimental Therapeutics and Translational Oncology Program, and Biomedicine Project 2009); Fundación de Investigación Médica Mutua Madrileña; Fundación “la Caixa” grant BM05-30-0; Caja Navarra Foundation; Department of Health of the Government of Navarra (“Ortiz de Landázuri, 2009” project); and AGAUR-Generalitat de Catalunya grant 2005SGR-00549. C. Gajate is supported by the Ramón y Cajal Program from the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain. A. Estella-Hermoso de Mendoza is supported by Department of Education of the Basque Government research grant BF106.37. M. de Frias is a recipient of a fellowship from the AGAUR-Generalitat de Catalunya. G. Roué holds a Miguel Servet research contract from Instituto de Salud Carlos III.

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 09/08/2009; revised 12/27/2009; accepted 12/30/2009; published OnlineFirst 03/16/2010.

- clinical application of alkylphospholipid analogues in combination with radiotherapy. *Cancer Treat Rev* 2007;33:191–202.
- Mollinedo F. Antitumor ether lipids: proapoptotic agents with multiple therapeutic indications. *Expert Opin Ther Patents* 2007;17:385–405.
- Mollinedo F, Fernandez-Luna JL, Gajate C, et al. Selective induction of apoptosis in cancer cells by the ether lipid ET-18-OCH₃ (edelfosine): molecular structure requirements, cellular uptake, and protection by Bcl-2 and Bcl-XL. *Cancer Res* 1997;57:1320–8.
- Gajate C, Fonteriz RI, Cabaner C, et al. Intracellular triggering of Fas, independently of FasL, as a new mechanism of antitumor ether lipid-induced apoptosis. *Int J Cancer* 2000;85:674–82.
- Gajate C, Mollinedo F. The antitumor ether lipid ET-18-OCH₃ induces apoptosis through translocation and capping of Fas/CD95 into membrane rafts in human leukemic cells. *Blood* 2001;98:3860–3.
- Gajate C, Del Canto-Janez E, Acuna AU, et al. Intracellular triggering of Fas aggregation and recruitment of apoptotic molecules into Fas-enriched rafts in selective tumor cell apoptosis. *J Exp Med* 2004;200:353–65.
- Gajate C, Mollinedo F. Edelfosine and perifosine induce selective apoptosis in multiple myeloma by recruitment of death receptors and downstream signaling molecules into lipid rafts. *Blood* 2007;109:711–9.
- Gajate C, Gonzalez-Camacho F, Mollinedo F. Involvement of raft aggregates enriched in Fas/CD95 death-inducing signaling complex in the antileukemic action of edelfosine in Jurkat cells. *PLoS One* 2009;4:e5044.
- Lacour S, Hammann A, Grazide S, et al. Cisplatin-induced CD95 redistribution into membrane lipid rafts of HT29 human colon cancer cells. *Cancer Res* 2004;64:3593–8.
- Delmas D, Rebe C, Micheau O, et al. Redistribution of CD95, DR4 and DR5 in rafts accounts for the synergistic toxicity of resveratrol

- and death receptor ligands in colon carcinoma cells. *Oncogene* 2004;23:8979–86.
21. Gajate C, Mollinedo F. Cytoskeleton-mediated death receptor and ligand concentration in lipid rafts forms apoptosis-promoting clusters in cancer chemotherapy. *J Biol Chem* 2005;280:11641–7.
 22. Mollinedo F, Gajate C. Fas/CD95 death receptor and lipid rafts: new targets for apoptosis-directed cancer therapy. *Drug Resist Updat* 2006;9:51–73.
 23. Reis-Sobreiro M, Gajate C, Mollinedo F. Involvement of mitochondria and recruitment of Fas/CD95 signaling in lipid rafts in resveratrol-mediated antimyeloma and antileukemia actions. *Oncogene* 2009;28:3221–34.
 24. Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000;1:31–9.
 25. Gajate C, Gonzalez-Camacho F, Mollinedo F. Lipid raft connection between extrinsic and intrinsic apoptotic pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;380:780–4.
 26. Gajate C, Santos-Beneit AM, Macho A, et al. Involvement of mitochondria and caspase-3 in ET-18-OCH₃-induced apoptosis of human leukemic cells. *Int J Cancer* 2000;86:208–18.
 27. Blanco-Prieto MJ, Campanero MA, Mollinedo F. Quantitative determination of the antitumor alkyl ether phospholipid edelfosine by reversed-phase liquid chromatography-electrospray mass spectrometry: application to cell uptake studies and characterization of drug delivery systems. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004;810:85–92.
 28. Gajate C, Barasoain I, Andreu JM, Mollinedo F. Induction of apoptosis in leukemic cells by the reversible microtubule-disrupting agent 2-methoxy-5-(2',3',4'-trimethoxyphenyl)-2,4,6-cycloheptatrien-1-one: protection by Bcl-2 and Bcl-XL and cell cycle arrest. *Cancer Res* 2000;60:2651–9.
 29. Schon A, Freire E. Thermodynamics of intersubunit interactions in cholera toxin upon binding to the oligosaccharide portion of its cell surface receptor, ganglioside GM1. *Biochemistry* 1989;28:5019–24.
 30. Harder T, Scheiffele P, Verkade P, Simons K. Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J Cell Biol* 1998;141:929–42.
 31. Plumas J, Jacob MC, Chaperot L, Molens JP, Sotto JJ, Bensa JC. Tumor B cells from non-Hodgkin's lymphoma are resistant to CD95 (Fas/Apo-1)-mediated apoptosis. *Blood* 1998;91:2875–85.
 32. Mollinedo F, Gajate C. FasL-independent activation of Fas. In: Wajant H, editor. *Fas signaling*, chapter 2. Georgetown (TX): Landes Bioscience and Springer Science; 2006, p. 13–27.
 33. Mollinedo F. Death receptors in multiple myeloma and therapeutic opportunities. In: Lonial S, editor. *Myeloma therapy. Pursuing the plasma cell*, chapter 25. Totowa (NJ): Humana Press; 2008, p. 393–419.
 34. Candal FJ, Bosse DC, Vogler WR, Ades EW. Inhibition of induced angiogenesis in a human microvascular endothelial cell line by ET-18-OCH₃. *Cancer Chemother Pharmacol* 1994;34:175–8.
 35. Zerp SF, Vink SR, Ruiten GA, et al. Alkylphospholipids inhibit capillary-like endothelial tube formation *in vitro*: antiangiogenic properties of a new class of antitumor agents. *Anticancer Drugs* 2008;19:65–75.
 36. de Mendoza AE, Campanero MA, de la Iglesia-Vicente J, Gajate C, Mollinedo F, Blanco-Prieto MJ. Antitumor alkyl ether lipid edelfosine: tissue distribution and pharmacokinetic behavior in healthy and tumor-bearing immunosuppressed mice. *Clin Cancer Res* 2009;15:858–64.
 37. Mollinedo F, Gajate C, Morales AI, et al. Novel anti-inflammatory action of edelfosine lacking toxicity with protective effect in experimental colitis. *J Pharmacol Exp Ther* 2009;329:439–49.

Isoform-selective phosphoinositide 3-kinase inhibitors induce apoptosis in chronic lymphocytic leukaemia cells

Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) has been reported to be constitutively active in chronic lymphocytic leukaemia (CLL), and to contribute to increased cell survival and resistance to apoptosis (Barragan *et al*, 2002; Pleyer *et al*, 2009). PI3Ks generate phosphoinositide lipids in response to extracellular stimuli, regulating survival, proliferation, differentiation and migration (Manning & Cantley, 2007). PI3K class I are heterodimers that consist of a catalytic subunit and a regulatory subunit, and are further divided into class IA (p110 α , β and δ), activated downstream tyrosine kinase receptors and class IB (p110 γ), activated downstream G protein-coupled receptors (Engelman *et al*, 2006). p110 α and β are widely distributed whereas p110 δ and γ are mainly, but not exclusively, expressed in leucocytes.

LY294002 and wortmannin have been largely used as PI3K inhibitors. However, neither of them can discriminate between the different isoforms of PI3K. Recently, isoform-selective PI3K inhibitors have been described (Jackson *et al*, 2005; Marone *et al*, 2008; Draghetti *et al*, 2009). Here, we have examined the effect of isoform-selective PI3K inhibitors (Table I) in the viability of CLL cells and lymphocytes from healthy donors.

Chronic lymphocytic leukaemia was diagnosed according to standard clinical and laboratory criteria. Blood samples were obtained from the Hospital de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Spain. Mononuclear cells from peripheral blood samples were isolated and cultured as previously described (Barragan *et al*, 2002).

First, the ability of isoform-selective PI3K inhibitors to induce apoptosis in CLL cells was examined. Apoptosis was determined by annexin V-fluorescein isothiocyanate (Bender MedSystems, Vienna, Austria) and propidium iodide (PI;

Bender MedSystems) double staining, as previously described (Barragan *et al*, 2002), and cell viability was measured as the percentage of annexin V and PI double-negative cells. Samples were acquired and data was analysed by using the FACSCalibur and CellQuest software (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA). Thus, CLL cells from 5 different patients were incubated with a range of concentrations (5–50 $\mu\text{mol/l}$) of isoform-selective PI3K inhibitors for 24 and 48 h and the cell viability was measured. PI3K inhibitors induced apoptosis in a dose- and time-dependent manner (Fig 1A, $n = 5$), except MSC1822169B (p110 γ inhibitor), which did not induce apoptosis in CLL cells. The inhibitors that showed a stronger effect on cell viability were MSC1902994A (p110 α inhibitor), MSC1829899A (p110 δ inhibitor) and MSC1831419A (p110 β and δ inhibitor). LY294002 was used as a control for broad PI3K inhibition. Incubation of CLL cells with 20 $\mu\text{mol/l}$ LY294002 for 24 and 48 h reduced cell viability to $58 \pm 6\%$ and $50 \pm 10\%$, respectively ($n = 5$).

The isoform-selective PI3K inhibitors were then tested in samples from 22 CLL patients. Surprisingly, CLL cells from five of the 22 patients showed resistance to PI3K inhibitor-induced apoptosis when incubated with 10 $\mu\text{mol/l}$ isoform-selective PI3K inhibitors. The samples were grouped into two classes, designated as sensitive and resistant, according to whether the apoptosis induced by all the isoform-selective PI3K inhibitors at 48 h was higher or lower than 20% when compared to the controls. The patients resistant to all PI3K inhibitors were also resistant to LY294002-induced apoptosis (Fig 1B).

Cells from the sensitive patients were examined to determine whether the combination of two or more PI3K inhibitors could increase the apoptosis induced by a single PI3K inhibitor treatment. CLL cells were incubated with one, two or three inhibitors at the same time, and cell viability was measured at 48 h. Isoform-selective PI3K inhibitors showed additive effects for inducing apoptosis of CLL cells, but no combination induced synergistic effects on cell viability (Fig 1C).

The sensitivity of normal B and T cells to apoptosis induced by isoform-selective PI3K inhibitors was analysed by co-incubating cells with anti-CD3-allophycocyanin and anti-CD19-phycoerythrin antibodies (Becton Dickinson), and the percentage of non-apoptotic cells was determined for CD19⁺/CD3⁻ cells (B cells) and CD19⁻/CD3⁺ (T cells). The number of apoptotic B and T cells was measured in CLL samples and blood samples from healthy donors exposed to PI3K inhibitors for 48 h. Incubation with 10 $\mu\text{mol/l}$ isoform-selective PI3K inhibitors reduced the percentage of viable CLL cells ($n = 9$)

Table I. *In vitro* enzymatic IC₅₀ values of different PI3K inhibitors on class I PI3K.

Inhibitor	Alternative name	<i>In vitro</i> IC ₅₀ ($\mu\text{mol/l}$)*			
		α	β	δ	γ
MSC1902994A	AS702630	0.01	>10	0.46	0.33
MSC1831419A	TGX-115	>20	0.05	0.16	>20
MSC1829899A	IC87114	>20	1.82	0.07	1.24
MSC1822169B	AS252424	1	>20	>20	0.03
LY294002		0.7	0.31	1.33	7.26

*IC₅₀ (50% inhibitory concentration) was calculated as described (Bilancio *et al*, 2006).

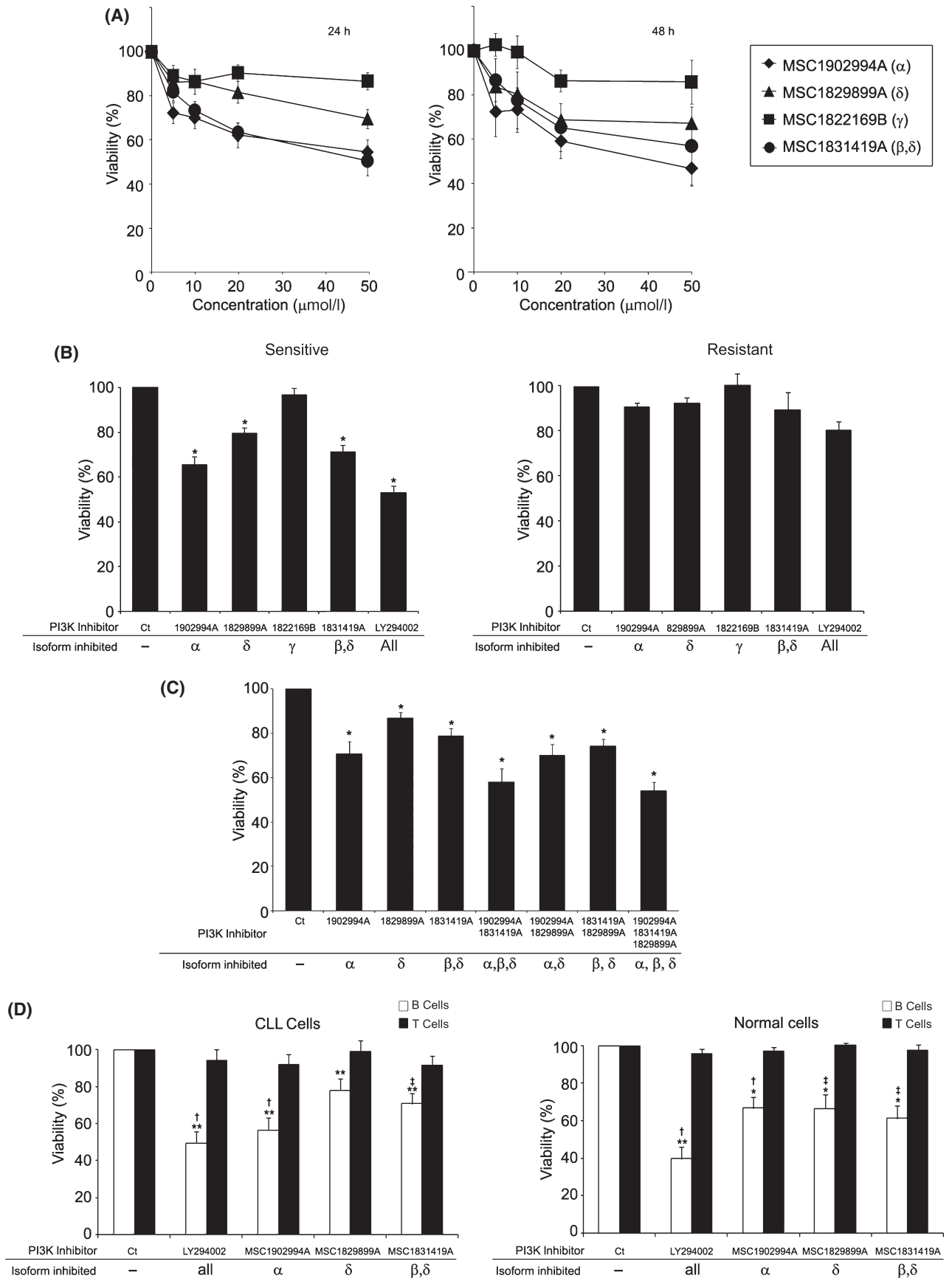


Fig 1. Cytotoxic effect of isoform-specific PI3K inhibitors on CLL cells and on cells from healthy donors. (A) Cells from CLL patients were incubated for 24 and 48 h with or without a range of doses (5, 10, 20, 50 $\mu\text{mol/l}$) of MSC1902994A, MSC1829899A, MSC1822169B, MSC1831419A ($n = 5$). (B) Cells from CLL patients were incubated for 48 h with 10 $\mu\text{mol/l}$ MSC1902994A, 10 $\mu\text{mol/l}$ MSC1829899A, 10 $\mu\text{mol/l}$ MSC1822169B, 10 $\mu\text{mol/l}$ MSC1831419A or 20 $\mu\text{mol/l}$ LY294002 ($n = 22$, five samples were resistant and 17 samples were sensitive). (C) Cells from CLL patients were incubated for 48 h with 10 $\mu\text{mol/l}$ MSC1902994A, 10 $\mu\text{mol/l}$ MSC1829899A, 10 $\mu\text{mol/l}$ MSC1831419A, or with combinations of two or three inhibitors ($n = 8$). (D) Cells from CLL patients ($n = 9$) and normal cells from healthy donors ($n = 4$) were incubated for 48 h with 20 $\mu\text{mol/l}$ LY294002 or 10 $\mu\text{mol/l}$ MSC1902994A, 10 $\mu\text{mol/l}$ MSC1829899A or 10 $\mu\text{mol/l}$ MSC1831419A. Viability was measured by analysis of phosphatidylerine exposure and propidium iodide uptake (A, B, C) or as nonapoptotic CD3⁺/CD19⁻ T cells or CD3⁻/CD19⁺ B cells (D), and is expressed as the percentage of the viability of untreated cells. Data are shown as the mean value \pm SEM. (B, C) * $P < 0.001$ treated versus untreated cells. (D) ** $P < 0.005$, * $P < 0.01$ treated versus untreated cells, † $P < 0.005$, ‡ $P < 0.01$ B cells versus T cells.

(Fig 1D). In contrast, T cells from CLL samples were resistant to the isoform-selective PI3K inhibitors ($n = 9$). Incubation with 10 $\mu\text{mol/l}$ isoform-selective PI3K inhibitors also reduced the percentage of viable normal B cells derived from healthy donors, whereas T cells derived from healthy donors were resistant to isoform-selective PI3K inhibitor-induced apoptosis ($n = 4$) (Fig 1D). These results indicate that normal and leukaemic B cells are more sensitive than T cells to isoform-selective PI3K inhibitor-induced apoptosis.

Here, we have analysed the contribution of PI3K isoforms to CLL cell survival, using a set of recently developed isoform selective class I PI3K inhibitors. Our results show that inhibition of p110 α , β and δ induced apoptosis whereas inhibition of p110 γ did not affect the viability of CLL cells, suggesting that p110 α , β and δ are contributing to maintain basal CLL cell viability. Similar results using two other p110 α inhibitors (PIK90 and PI103) and the same inhibitors for p110 β and p110 δ , have been recently reported (Niedermeier *et al*, 2009). It has been described that p110 δ contributes to 60% of total PI3K activity in normal B cells whereas p110 α and β only represent the 40% of the remaining activity (Bilancio *et al*, 2006). p110 δ is the isoform mostly involved in signalling through the interleukin 4 and B-cell receptors in normal B cells (Bilancio *et al*, 2006). However our results suggest that the most important PI3K isoform in CLL cell survival is p110 α .

Interestingly, some patients were resistant to the apoptosis induced by PI3K inhibitors, suggesting that, in these patients, pathways other than PI3K could be activated to maintain cell viability. Our results indicate that B cells are more sensitive than T cells to the specific PI3K-isoform inhibition. Chemotherapeutic drugs induce apoptosis equally in both B and T cells, leading to immunosuppression (Hamblin & Hamblin, 2008). Thus, the differential effect of PI3K inhibitors on B and T cells is of interest. In conclusion, we propose that isoform-selective PI3K inhibitors may provide a novel therapeutic option for CLL patients.

Acknowledgements

This study was supported by grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación and FEDER (SAF2007-60964 and ISCIII-RTICC RD06/0020), and the AGAUR-Generalitat de Catalunya (2005SGR-00549). MdeF is a recipient of a fellowship from the AGAUR-Generalitat de Catalunya, AMC, DMGG, APP and

CRP are recipients of research fellowships from the Ministerio de Ciencia e Innovación, and DIS is recipient of fellowship from the José Carreras International Leukemia Foundation (FIJC-07/ESP-FCAJAMADRID). We also thank the Unitat de Biologia and the Unitat de Genòmica from the Serveis Científicotècnics at the Universitat de Barcelona for their technical support.

Disclosure of conflicts of interest

Thomas Rückle and Montserrat Camps are employed by Merck Serono SA.

Mercè de Frias¹

Daniel Iglesias-Serret¹

Ana M. Cosialls¹

Diana M. González-Gironès¹

Alba Pérez-Perarnau¹

Camila Rubio-Patiño¹

Thomas Rückle²

Montserrat Camps²

Alberto Fernández de Sevilla³

Esmeralda de la Banda⁴

Gabriel Pons¹

Joan Gil¹

¹Departament de Ciències Fisiològiques II, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL)–Universitat de Barcelona, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain, ²Departments of Chemistry and Signal Transduction, Merck Serono SA, Research Centre Geneva, Geneva, Switzerland, ³Departament d'Hematologia Clínica, IDIBELL-Institut Català d'Oncologia, L'Hospitalet de Llobregat, and ⁴Servei d'Hematologia, IDIBELL–Hospital de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain.

E-mail: jgil@ub.edu

References

- Barragan, M., Bellosillo, B., Campas, C., Colomer, D., Pons, G. & Gil, J. (2002) Involvement of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in the survival of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*, **99**, 2969–2976.
- Bilancio, A., Okkenhaug, K., Camps, M., Emery, J.L., Rückle, T., Rommel, C. & Vanhaesebroeck, B. (2006) Key role of the p110delta isoform of PI3K in B-cell antigen and IL-4 receptor signaling:

- comparative analysis of genetic and pharmacologic interference with p110delta function in B cells. *Blood*, **107**, 642–650.
- Draghetti, C., Salvat, C., Zanoguera, F., Curchod, M.L., Vignaud, C., Peixoto, H., Di Cara, A., Fischer, D., Dhanabal, M., Andreas, G., Abderrahim, H., Rommel, C. & Camps, M. (2009) Functional whole-genome analysis identifies polo-like kinase 2 and poliovirus receptor as essential for neuronal differentiation upstream of the negative regulator alphaB-crystallin. *The Journal of Biological Chemistry*, **284**, 32053–32065.
- Engelman, J.A., Luo, J. & Cantley, L.C. (2006) The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature Reviews. Genetics*, **7**, 606–619.
- Hamblin, A.D. & Hamblin, T.J. (2008) The immunodeficiency of chronic lymphocytic leukaemia. *British Medical Bulletin*, **87**, 49–62.
- Jackson, S.P., Schoenwaelder, S.M., Goncalves, I., Nesbitt, W.S., Yap, C.L., Wright, C.E., Kenche, V., Anderson, K.E., Dopheide, S.M., Yuan, Y., Sturgeon, S.A., Prabakaran, H., Thompson, P.E., Smith, G.D., Shepherd, P.R., Daniele, N., Kulkarni, S., Abbott, B., Saylik, D., Jones, C., Lu, L., Giuliano, S., Hughan, S.C., Angus, J.A., Robertson, A.D. & Salem, H.H. (2005) PI 3-kinase p110beta: a new target for antithrombotic therapy. *Nature Medicine*, **11**, 507–514.
- Manning, B.D. & Cantley, L.C. (2007) AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, **129**, 1261–1274.
- Marone, R., Cmiljanovic, V., Giese, B. & Wymann, M.P. (2008) Targeting phosphoinositide 3-kinase: moving towards therapy. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **1784**, 159–185.
- Niedermeier, M., Hennessy, B.T., Knight, Z.A., Henneberg, M., Hu, J., Kurtova, A.V., Wierda, W.G., Keating, M.J., Shokat, K.M. & Burger, J.A. (2009) 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*, **113**, 5549–5557.
- Pleyer, L., Egle, A., Hartmann, T.N. & Greil, R. (2009) Molecular and cellular mechanisms of CLL: novel therapeutic approaches. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, **6**, 405–418.

Keywords: chronic lymphocytic leukaemia, apoptosis, phosphoinositide 3-kinase.