



# Bases moleculars de l'activitat antitumoral de la lenalidomida en el limfoma de cèl·lules del mantell

Alexandra Moros Sanz

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

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

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

PROGRAMA DE DOCTORAT EN BIOMEDICINA  
Línia de recerca de Biologia molecular i cel·lular del càncer  
FACULTAT DE MEDICINA - UNIVERSITAT DE BARCELONA  
2011-2014



**B** Universitat de Barcelona

**BASES MOLECULARS DE L'ACTIVITAT  
ANTITUMORAL DE LA LENALIDOMIDA EN EL  
LIMFOMA DE CÈL·LULES DEL MANTELL**

Tesi presentada per

**Alexandra Moros Sanz**

Per optar al grau de

**Doctora en Biomedicina**

Tesi realitzada a l'Hospital Clínic de Barcelona-IDIBAPS sota la  
direcció del **Dr. Gaël Roué** i sota la tutela de la **Dra. Dolors Colomer  
Pujol**

**Alexandra Moros Sanz**

La doctoranda

**Dr. Gaël Roué**

El director de la tesi

**Dra. Dolors Colomer i Pujol**

La tutora de la tesi

Barcelona, setembre de 2014



**El Dr. Gaël Roué,**

investigador de l'Institut d'Investigacions Biomèdiques August  
Pi i Sunyer (IDIBAPS)

## CERTIFICA

- Que la tesi doctoral presentada per l'Alexandra Moros Sanz per tal d'accedir al títol de doctora i titulada "*Bases moleculars de l'activitat antitumoral de la lenalidomida en el limfoma de cèl·lules del mantell*", ha estat realitzada sota la seva direcció i compleix els requisits formals i científics per a ser defensada davant del tribunal corresponent.
- Que els dos articles i la carta derivats d'aquesta tesi doctoral han estat publicats a *Clinical Cancer Research* (2014) i a *Leukemia* (2014) i a *Leukemia & Lymphoma* (2014), respectivament.
- Que els factors d'impacte corresponents a l'any 2013 de les revistes científiques on s'han publicat els articles d'aquesta tesi doctoral són de:
  - *Clinical Cancer Research*: 8,193
  - *Leukemia*: 9,379
  - *Leukemia & Lymphoma*: 2,605
- Que el treball de *Clinical Cancer Research*, on l'Alexandra Moros Sanz comparteix primera coautoria, no ha estat utilitzat prèviament per a la realització de cap altra tesi doctoral i el treball ha estat realitzat en igual contribució amb l'altra primera coautora.

Barcelona, setembre de 2014



# ÍNDEX



ABREVIACIONS I ANGLICISMES	13
INTRODUCCIÓ	19
Desenvolupament del limfòcit B	22
1. El limfoma de cèl·lules del mantell	24
i. Diagnòstic	24
ii. Origen del MCL	26
iii. Curs clínic	27
iv. El rol de la ciclina D1 en el MCL	28
a. MCL ciclina D1 negatiu	31
v. Vies de senyalització alterades en el MCL	32
a. Cicle cel·lular	34
p27 <sup>KIP1</sup>	34
MYC	39
IRF4	47
b. Vies de resposta al dany del DNA	50
c. Vies de supervivència cel·lular	51
d. Vies implicades en la interacció amb el microambient	52
vi. Pronòstic	57
vii. Tractaments actuals	57
a. Quimioteràpia convencional	57
b. Noves aproximacions	60
Bortezomib	60
Temsirolimus	71
Lenalidomida	74
Ibrutinib	75
2. Fàrmacs immunomoduladors com estratègia terapèutica en les neoplàsies limfoides de cèl·lula B	78
i. Entitats químiques	79
a. Talidomida	79
b. Lenalidomida	80
c. Pomalidomida	80
ii. Mecanismes d'acció	81
a. Activitat antiinflamatòria associada a la inhibició de TNF $\alpha$	81
b. Coestimulació dels limfòcits T	81



c.	Augment de les funcions efectores dels limfòcits T citotòxics i de les cèl·lules NK	82
d.	Propietats antiangiogèniques	82
e.	Teratogenicitat	83
f.	Inhibició de la proliferació	83
g.	Inducció d'apoptosi	85
iii.	Combinacions amb altres fàrmacs en el MCL	86
a.	Lenalidomida amb rituximab	87
b.	Lenalidomida amb dexametasona	87
c.	Triple combinació de lenalidomida, rituximab i dexametasona	88
d.	Lenalidomida i bortezomib	89
	OBJECTIUS	93
	RESULTATS	97
	<b>Primer treball</b>	97
	L'activitat antitumoral de la lenalidomida en models de limfoma de cèl·lules del mantell <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> comporta la desestabilització dels complexos de ciclina D1/p27 <sup>KIP1</sup> . ( <i>Antitumoral activity of lenalidomide in in vitro and in vivo models of mantle cell lymphoma involves the destabilization of cyclin D1/p27<sup>KIP1</sup> complexes.</i> )	
	<b>Segon treball</b>	119
	L'expressió i la localització subcel·lular de l'inhibidor de la cinasa dependent de ciclina p27 no es correlacionen amb el patró de proliferació de les cèl·lules del limfoma del mantell. ( <i>Expression and subcellular localization of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 does not correlate with proliferation pattern of mantle lymphoma cells.</i> )	
	<b>Tercer treball</b>	127
	Activitat antitumoral sinèrgica de la lenalidomida amb l'inhibidor del bromodomini BET CPI203 en el limfoma de cèl·lules del mantell resistent a bortezomib. ( <i>Synergistic antitumor activity of lenalidomide with the BET bromodomain inhibitor CPI203 in bortezomib-resistant mantle cell lymphoma.</i> )	
	<b>Resum dels resultats</b>	151

DISCUSSIÓ	161
CONCLUSIONS	177
BIBLIOGRAFIA	181
ANNEXOS	209
Annex 1: Presentacions en congressos derivades d'aquesta tesi	209
Annex 2: Altres publicacions en col·laboració	211
AGRAÏMENTS	221

ÍNDEX DE FIGURES I TAULES

Figura 1. Procés de diferenciació de la cèl·lula B	23
Figura 2. Variants histològiques del MCL	25
Figura 3. Model de l'origen del MCL	28
Figura 4. Regulació del cicle cel·lular	29
Figura 5. Model de les vies senyalització que regulen p27 <sup>KIP1</sup>	36
Figura 6. Estructura química dels compostos (+)-JQ1 i CPI203	46
Figura 7. Senyalització mitjançant quimiocines i citocines entre la cèl·lula B i el microambient tumoral	55
Figura 8. Vies implicades en la inhibició del proteasoma en cèl·lules canceroses	62
Figura 9. Via de NF- $\kappa$ B	63
Figura 10. Família proteica Bcl-2	65
Figura 11. Resposta a proteïnes desplegadas	67
Figura 12. Expressió gènica durant la diferenciació plasmocítica	69
Figura 13. Model de resistència a bortezomib en el MCL	70
Figura 14. Via de PI3K/Akt/mTOR	72
Figura 15. Via del BCR	76
Figura 16. Estructura química dels IMiD	79
Figura 17. Mecanismes d'acció de la lenalidomida	86
Taula 1. Selecció d'alteracions genòmiques recurrents en el MCL	33
Taula 2. Receptors de quimiocines i molècules d'adhesió en el MCL	56

ABREVIACIONES I

ANGLICISMES



ABC: *Activated B-Cell-like*  
ADCC: *Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity*  
AGC: *cAMP-dependent protein kinase/protein kinase G/protein kinase C kinase family*  
APC: *Antigen-presenting cell*  
ARF: *Alternate Reading Frame*  
ATF: *Activating Transcription Factor*  
ATM: *Ataxia Telangiectasia Mutated*  
BAFF: *B-cell Activating Factor*  
Bcl: *B-Cell Lymphoma*  
BCMA: *B Cell Maturation Antigen*  
BCR: *B-Cell Receptor*  
BET: *Bromodomain and Extra-Terminal domain*  
bHLH: *basic Helix-Loop-Helix*  
BiP: *Binding immunoglobulin Protein*  
Blimp-1: *B-lymphocyte-induced maturation protein 1*  
BLNK: *B-Cell Linker*  
BMP: *Bone Morphogenetic Protein*  
BMSC: *Bone Marrow Stromal Cells*  
BRD: *Bromodomain*  
Btk: *Bruton's Tyrosine Kinase*  
CAK: *CDK Activating Kinase*  
CCL: *Chemokine (C-C motif) Ligand*  
CD: *Cluster of Differentiation*  
CDK: *Cyclin-Dependent Kinase*  
cFLIP: *cellular FLICE-Inhibitory Protein*  
CHOP: *C/EBP homologous protein*  
cIAPs: *cellular Inhibitors of Apoptosis Proteins*  
CIP: *CDK Interacting Protein*  
CKI: *CDK Inhibitory protein*  
CLL: *Chronic Lymphocytic Leukemia*  
COX: *Cyclooxygenase*  
CXCL: *chemokine (C-X-C motif) Ligand*  
CXCR: *C-X-C chemokine Receptor*  
DLBCL: *Diffuse Large B-Cell Lymphoma*  
DNA: *Deoxyribonucleic acid*

DYRK: *Dual Tyrosine phosphorylation Related Kinase*  
ECM: *Extracellular Matrix*  
eIF: *Eukaryotic Initiation Factor*  
EIF4EBP1: *Eukaryotic translation Initiation Factor 4E Binding Protein 1*  
EMA: *European Medicines Agency*  
ERK: *Extracellular signal-Regulated Kinase*  
FDA: *Food and Drug Administration*  
FDC: *Follicular Dendritic Cells*  
FGF: *Fibroblast Growth Factor*  
FoxM1: *Forkhead Box M1*  
GAP: *GTPase activating protein*  
GCB: *GC B-Cell-like*  
Grp78: *78 kDa glucose-regulated protein*  
GSEA: *Gene Set Enrichment Analysis*  
GTP: *Guanosine Triphosphate*  
HDAC: *Histone Deacetylase*  
Hsp: *Heat Shock Protein*  
IFN: *Interferon*  
Ig: *Immunoglobulin*  
IGF-1: *Insulin-like Growth Factor 1*  
IGHV: *Immunoglobulin Variable Heavy-chain*  
IHQ: *Immunohistochemistry*  
IKK: *I $\kappa$ B Kinase*  
IL: *Interleukin*  
IMiD: *Immunomodulatory drug*  
IRE: *inositol-requiring enzyme*  
IRF: *Interferon Regulatory Factor*  
ISRE: *Interferon Stimulated Response Elements*  
ITAM: *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*  
I $\kappa$ B: *Inhibitor of  $\kappa$ B*  
JAK: *Janus Kinase*  
JNK: *c-Jun N-terminal protein Kinase*  
KEAP1: *Kelch-like ECH-Associated Protein 1*  
KIP: *Kinase Inhibitory Protein*  
KIS: *Kinase Interacting Stathmin*  
KPC: *Kip1 ubiquitylation-Promoting Complex*

LDHA: *Lactate Dehydrogenase A*  
LPAM: *Lymphocyte Peyer's patch Adhesion Molecule*  
LPS: *Lipopolysaccharide*  
MAPK: *Mitogen-Activated Protein Kinase*  
MCL: *Mantle Cell Lymphoma*  
Mcl-1: *Myeloid Cell Leukemia-1*  
MCT: *Mono-Carboxylate Transporter*  
MDS: *Myelodysplastic Syndrome*  
Mitf: *Microphthalmia-associated transcription factor*  
MM: *Multiple Myeloma*  
mTOR: *Mammalian Target Of Rapamycin*  
mTORC: *mTOR Complex*  
NF- $\kappa$ B: *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*  
NHL: *Non-Hodgkin Lymphoma*  
NIK: *NF- $\kappa$ B Inducing Kinase*  
NK: *Natural Killer*  
NLS: *Nuclear Localization Signal*  
NRF2: *NFE2-Related Factor 2*  
ORR: *Overall Response Rate*  
PAX: *Paired box*  
PBMC: *Peripheral Blood Mononuclear Cell*  
PDK1: *Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1*  
PECAM: *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule*  
PERK: *Pancreatic ER kinase (PKR)-like ER Kinase*  
PI3K: *Phosphoinositide 3-Kinase*  
PIP<sub>2</sub>: *Phosphatidylinositol diphosphate*  
PIP<sub>3</sub>: *Phosphatidylinositol triphosphate*  
PIR: *Proteasome Inhibitor Resistant*  
PK: *Protein Kinase*  
PLC: *Phospholipase C*  
PRDM1: *PR Domain zinc finger protein 1*  
PSMB5: *Proteasome (prosome, macropain) subunit, Beta type, 5*  
P-TEFb: *Positive Transcription Elongation Factor b*  
PTEN: *Phosphatase and Tensin homolog*  
Rb: *Retinoblastoma*  
RHEB: *Ras Homolog Enriched in Brain*



RhoA: *Ras homolog gene family, member A*  
RNA: *Ribonucleic acid*  
ROCK1: *Rho-associated Coiled-coil-containing protein Kinase 1*  
ROS: *Reactive Oxygen Species*  
RTK: *Receptor Tyrosine Kinase*  
S6K: *S6 Kinase*  
SCF: *Skp1-Cullin-F-box*  
Skp: *S-phase Kinase-associated Protein*  
SOX: *SRY-Related HMG-Box*  
STAT: *Signal Transducer and Activator of Transcription*  
Syk: *Spleen Tyrosine Kinase*  
TACI: *Transmembrane Activator and CAML Interactor*  
TG: *Transglutaminase*  
TGF: *Transforming Growth Factor*  
TLR: *Toll-Like Receptor*  
TNF: *Tumor Necrosis Factor*  
TRAIL: *TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*  
TSC: *Tuberous Sclerosis Protein*  
UPR: *Unfolded Protein Response*  
UPS: *Ubiquitin-Proteasome System*  
VCAM: *Vascular Cell Adhesion Protein*  
VEC: *Vascular Endothelial Cells*  
VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*  
VLA-4: *Very Late Antigen 4*  
XBP1: *X-box Binding Protein 1*

# INTRODUCCIÓ



L'existència del càncer es coneix des de fa segles. El terme càncer prové de la paraula grega *karkinoma* o *karkinos*, encunyada pel metge de l'Antiga Grècia Hipòcrates (460-375 aC). Però no va ser ell qui va descobrir la malaltia: en el papir redactat l'any 1500 aC descobert per l'Ebers ja es parla del càncer, tot i que no es fa servir aquest nom. Sembla però, que va ser Galè (203-131 aC) qui va proposar una primera teoria sobre la carcinogènesi en considerar el càncer com un desequilibri entre els humors de l'organisme.

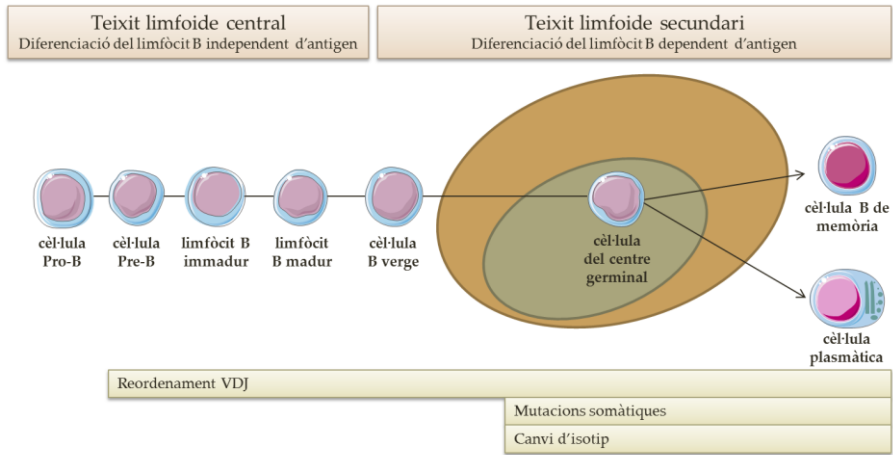
No va ser fins el segle XVIII que Pott (1713-1788) va associar el càncer d'escrot amb l'ofici d'escura-xemeneies. I més endavant, el 1914, Boveri va enunciar el principi de la carcinogènesi en reconèixer que el defecte fonamental que condueix al desenvolupament del càncer resideix en el material genètic de la cèl·lula.(1, 2)



Les neoplàsies limfoïdes de cèl·lula B constitueixen un grup heterogeni de tumors, en què els limfòcits B madurs es veuen afectats i existeix manifestació de la malaltia a òrgans limfoïdes secundaris o a teixits extranodals. El terme recull més de 20 malalties diferents i entre elles es troba el limfoma de cèl·lules del mantell o MCL (*Mantell Cell Lymphoma*). Cada entitat clínica requereix d'un tractament específic ja que cadascuna té la seva pròpia evolució, determinada en funció de l'estadi de desenvolupament i diferenciació en què es troben els limfòcits B tumorals, l'estructura del receptor de cèl·lula B o BCR (*B-Cell Receptor*) i l'adquisició de translocacions cromosòmiques específiques.(3, 4)

## Desenvolupament del limfòcit B

Per poder entendre la fisiopatologia del limfoma de cèl·lules del mantell, hem de comprendre també la fisiologia del limfòcit B. Els limfòcits B són un tipus cel·lular que s'encarrega del manteniment de la immunitat. Aquests s'originen i maduren en els òrgans limfoides centrals (medul·la òssia) a partir de les cèl·lules mare precursors. Aquí té lloc el primer pas de la seva diferenciació amb el reordenament dels segments V (*variable*), D (*diversity*) i J (*joining*) dels gens de les immunoglobulines. A continuació, els limfòcits s'ubiquen en els òrgans limfàtics secundaris (ganglis limfàtics), on s'acumulen. Els ganglis limfàtics s'estructuren en diferents parts: centre germinal, on les cèl·lules proliferen en contacte amb l'antigen, la zona del mantell, on s'hi troben els limfòcits madurs *naïve* (verges) i la zona marginal, formada per cèl·lules B de memòria. Quan els limfòcits entren en contacte amb un antigen, que li és presentat per una cèl·lula presentadora d'antigen o APC (*Antigen-Presenting Cell*), s'hi inicien els processos de: 1. Mutació somàtica, per tal d'augmentar l'afinitat per l'antigen; i 2. Canvi d'isotip, que és un canvi en la regió constant de la immunoglobulina, per canviar l'acció efectora d'aquesta però no la seva especificitat per l'antigen. Així evolucionen i abandonen el gangli limfàtic diferenciades en cèl·lules B plasmàtiques, productores d'anticossos o en cèl·lules B de memòria, que podran reconèixer més ràpid el mateix antigen davant d'una altra exposició futura (Figura 1).(5)



**Figura 1. Procés de diferenciació de la cèl·lula B.** La cèl·lula B precursora es desenvolupa des de la cèl·lula mare hematopoètica en el moll de l'os abans de migrar cap als teixits limfàtics perifèrics com a limfòcit B madur verge. Durant l'estadi pre-B s'inicia la recombinació dels segments VDJ de les immunoglobulines. El procés d'hipermutació somàtica ja té lloc en el centre germinal del fol·licle limfoide en resposta a l'estimulació amb l'antigen, on també té lloc el canvi d'isotip des d'IgM i IgD a IgG, IgA o IgE.(5)



## 1. El limfoma de cèl·lules del mantell

---

El limfoma de cèl·lules del mantell és un tipus de limfoma no Hodgkin o NHL (*Non-Hodgkin Lymphoma*), que es caracteritza per una proliferació anòmala de limfòcits B madurs. El marcador més destacat del MCL és la translocació t(11;14)(q13;q32) que té com a conseqüència la sobreexpressió de la ciclina D1 de resultes de la juxtaposició del gen *CCND1* amb el complex de la cadena pesada de les immunoglobulines (*IGH*).<sup>(6)</sup>

El MCL en constitueix el 2-10 % de tots el LNH. A Europa, la incidència anual de MCL ha estat estimada en 0,45 casos cada 100 000 persones, similar al que té lloc als Estats Units d'Amèrica (0,51-0,55 cada 100 000 individus).<sup>(7)</sup>

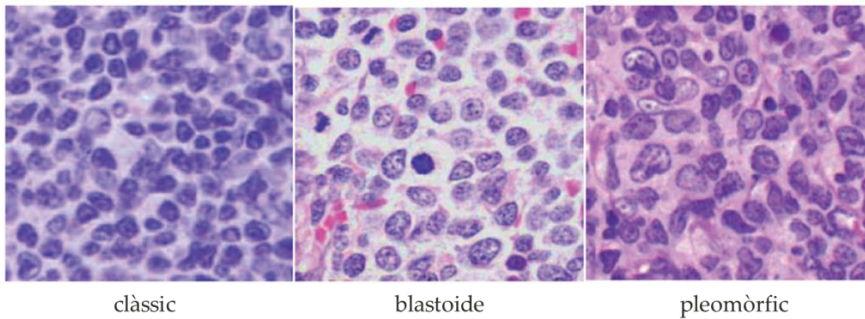
Típicament, el MCL té una presentació disseminada: els pacients presenten limfadenopatia generalitzada, infiltració en el moll de l'os, esplenomegàlia, hepatomegàlia, afectació gastrointestinal i també existeix component leucèmic en el 20-30 % dels casos.<sup>(8, 9)</sup>

El MCL és una de les neoplàsies B més difícils de tractar: tot i que les remissions són freqüents en pacients prèviament no tractats, és comú que passats uns anys n'apareguin recaigudes. Això fa que la supervivència mitjana de la malaltia actualment sigui de 5-7 anys. Ara no en disposem de tractaments curatius, tot i que la intensificació del tractament de primera línia ha millorat la supervivència lliure de progressió.<sup>(9)</sup>

### i. Diagnòstic

El diagnòstic del MCL es fa a través de l'estudi de les biòpsies dels ganglis limfàtics, de la medul·la òssia, d'altres teixits afectats o de l'anàlisi de les extraccions de sang. Per tal de diagnosticar un pacient de la malaltia s'estudien l'immunofenotip i la morfologia de les cèl·lules.<sup>(10, 11)</sup>

Quant a l'estudi de la morfologia, preferentment es fan servir les biòpsies de teixit dels ganglis limfàtics i de la medul·la òssia. En pacients en què no és possible aconseguir aquestes mostres de teixits (per exemple perquè tinguin esplenomegàlia i presentació leucèmica de la malaltia) l'estudi es basa en les mostres de sang perifèrica. Llavors s'analitza la morfologia dels limfòcits, que seran típicament de mida petita-mitjana amb contorn nuclear irregular. El diagnòstic pot ser basat en la morfologia, l'immunofenotip i la presència de la translocació t(11;14) en cèl·lules sanguínies perifèriques. Les principals variants histològiques inclouen la clàssica, la blastoide i la pleomòrfica (Figura 2).(5, 8, 9)



**Figura 2. Variants histològiques del MCL.** Morfològicament, el MCL té diferents variants citològiques. Els MCL clàssics són caracteritzats per limfòcits de mida petita o mitjana amb nucli irregular i nuclèol discret. El MCL blastoide té nuclis rodons, cromatina finament dispersa i nuclèol discret. El MCL pleomòrfic consta de cèl·lules més grans amb nucli irregular i pleomòrfic i nuclèols petits i visibles. Les variants blastoide i pleomòrfica tenen ratis de proliferació més alts i cariotips més complexos i tetraploidització. A més, tots dos estan associats a un comportament clínic més agressiu.(5)

Pel que fa a la part immunofenotípica, el MCL es caracteritza per expressar les immunoglobulines de superfície IgM/IgD, així com els antígens associats al limfòcit B (CD20), antígens associats a la cèl·lula T (CD5) i FMC7. En contraposició, el MCL no presenta CD23, que és el marcador d'activació i creixement dels limfòcits B. També la sobreexpressió de la ciclina D1,

causada per la translocació t(11;14) és un dels indicadors de la malaltia. Aquesta sobreexpressió es pot detectar mitjançant immunohistoquímica o IHQ (*Immunohistochemistry*), o bé es pot detectar directament la translocació mitjançant la tècnica FISH (*Fluorescence In situ Hybridization*). La sobreexpressió del factor de transcripció SOX11 (*SRY-Related HMG-Box 11*) pot també ajudar en el diagnòstic del MCL. Recentment SOX11 ha estat descrit com un impulsor de senyals proangiogèniques en el MCL.(9, 11-13)

Un altre factor a considerar és determinar els nivells d'expressió de Ki-67, que té gran importància en la proliferació cel·lular i els nivells del qual són utilitzats com a marcador de proliferació. Una elevada proliferació tumoral s'associa a un pitjor pronòstic. El problema d'aquest procediment és la baixa reproductibilitat que presenta entre laboratoris de diferents centres.(8)

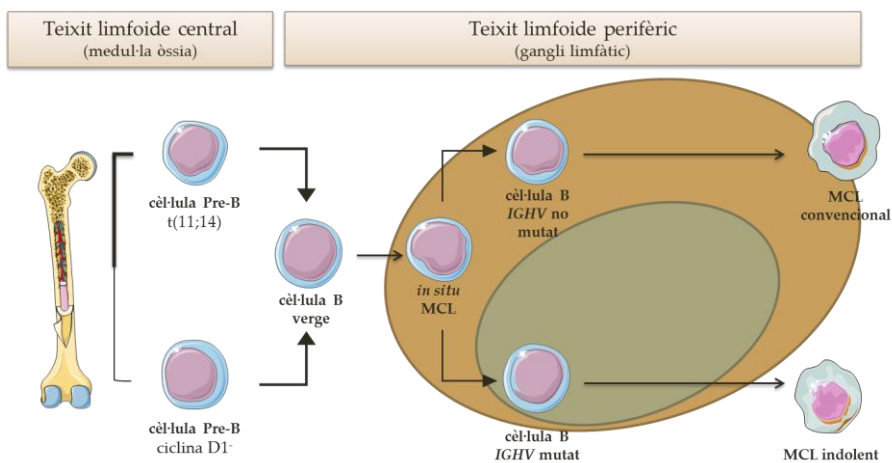
## **ii. Origen del MCL**

Tot i que no tots els casos de MCL sobreexpressen la ciclina D1, en la majoria la translocació t(11;14)(q13;q32), que juxtaposa el promotor de la cadena pesada de les immunoglobulines amb el gen de la ciclina D1, és considerat el primer mecanisme oncogènic en el desenvolupament de la malaltia. Aquesta té lloc a la medul·la òssia en un estadi primerenc de diferenciació de la cèl·lula B (pre-B). L'esdeveniment succeeix durant la recombinació dels segments V(D)J de la regió variable de la cadena pesada de les immunoglobulines o IGHV (*Immunoglobulin Variable Heavy-chain*). El MCL està compost per una població específica de limfòcits B madurs, indicant que el fenotip neoplàsic és adquirit en un estadi més avançat en el desenvolupament de la cèl·lula B. Tot i que es creu que la majoria de casos de MCL deriven de limfòcits B verges CD5<sup>+</sup> amb expressió d'IgM/IgD localitzats a la zona del mantell als fol·licles limfoides, existeix un percentatge minoritari de casos (15-40 %) en què les cèl·lules presenten hipermutacions

en el gen *IGHV*. Aquesta hipermutació somàtica és un procés de mutació programada en què les regions variables dels gens de les immunoglobulines muten per tal d'augmentar l'afinitat de la immunoglobulina per l'antigen que li és presentat al limfòcit en el centre germinal dels fol·licles limfoides. Per tant, els casos de MCL sense mutacions en *IGHV* poden derivar de limfòcits B verges, mentre que els casos que presenten mutacions poden derivar de limfòcits que han estat en contacte amb antígens en el centre germinal.(6)

### **iii. Curs clínic**

Encara que s'ha definit anteriorment el MCL com una neoplàsia molt agressiva que requereix tractaments agressius des del diagnòstic amb intensius règims de quimioteràpia i també trasplantaments de cèl·lules progenitores hematopoètiques, existeix un grup de pacients diagnosticats de MCL que presenten un curs clínic indolent de la malaltia amb una llarga supervivència, arribant fins i tot a 10 anys. Alguns d'ells, ni tan sols requereixen tractament amb quimioteràpia durant llargs períodes de temps. Pacients amb aquest tipus de MCL indolent característicament presenten malaltia leucèmica no nodal, amb una predominant tendència a patir hipermutació en *IGHV* i mostren cariotips poc complexos. També és distintiu el diferent patró d'expressió de la proteïna SOX11, que queda restringit al MCL convencional (Figura 3).(14)



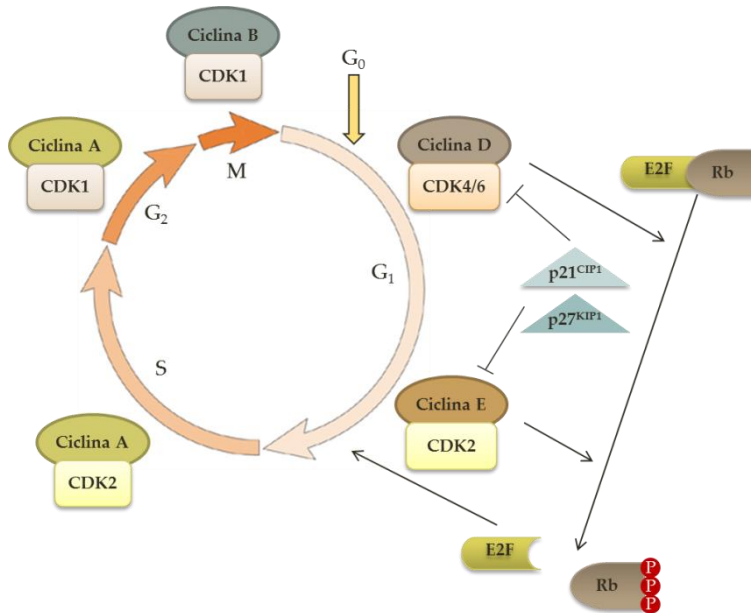
**Figura 3. Model de l'origen del MCL.** Els limfòcits B amb la t(11;14) s'originen al moll de l'os i a continuació migren cap als nòduls limfàtics, on colonitzen la zona del mantell. Aquells que no tinguin el gen *IGHV* mutat o el tinguin mínimament mutat seran genèticament inestables i tendiran a acumular més alteracions genètiques addicionals. Aquells que entrin al centre germinal i en portin a terme la hipermutació somàtica en *IGHV* seran genèticament més estables i tendiran a disseminar-se més per sang perifèrica que no pas en els ganglis. Una baixa proporció de MCL no presenta la translocació t(11;14).(6)

#### iv. El rol de la ciclina D1 en el MCL

Com abans s'ha comentat, la translocació t(11;14)(q13;q32) és considerada el primer esdeveniment en la malaltia. Tot i així, aquest no és l'únic mecanisme que es troba alterat en el MCL i que fa augmentar l'expressió de ciclina D1: hi ha altres mecanismes, com ara el reordenament cromosòmic secundari en el 3' del locus *CCND1* o mutacions en la regió 3' no traduïda (3'UTR) que comporten l'expressió de la ciclina D1 truncada, amb transcrits sense la regió 3'UTR. Aquests transcrits aconseguen augmentar la vida mitjana perquè perden llocs d'unió al microRNA.(15, 16)

La funció més coneguda de la ciclina D1 és la regulació positiva del cicle cel·lular. En les cèl·lules de MCL la ciclina D1, expressada constitutivament, s'uneix a la cinasa dependent de ciclina 4 o 6 o CDK4/6 (*Cyclin-Dependent*

*Kinase 4/6*) i activa el factor de transcripció E2F inhibint per fosforilació el seu inhibidor, el retinoblastoma (Rb). Això promou l'activació de ciclina E/CDK2 i l'entrada de la cèl·lula en fase S del cicle cel·lular (Figura 4).(6)



**Figura 4. Regulació del cicle cel·lular.** La maquinària del control del cicle cel·lular està formada essencialment per les ciclines i les CDK. Quan la cèl·lula abandona la quiescència, té lloc la formació de complexos de ciclines del tipus D amb CDK4 i CDK6. A la fase tardana de G1, es formen els complexos de ciclina E/CDK2 per tal d'iniciar la fase S.(29)

A més, la ciclina D1 té altres funcions oncogèniques en el MCL que encara no han pogut ser ben descrites. S'ha identificat una forma de la ciclina D1 anomenada ciclina D1b, codificada pel transcrit b i que fa que tingui un domini C-terminal diferent del de la ciclina D1 convencional. Aquest domini C-terminal divergent és deficient en motius que regulen el *turnover* de la ciclina D1, incloent-hi la seqüència PEST i el residu que controla l'exportació nuclear i l'estabilitat proteica (treonina 286). La ciclina D1b, en perdre el que controla l'exportació nuclear s'expressa en el nucli de manera constitutiva, quelcom que promou la transformació oncogènica alhora que no perd la seva

capacitat d'associació a CDK4. A més, aquesta ciclina es caracteritza per una capacitat transformadora major que la de la ciclina D1, suggerint que la ciclina D1b pot ser un oncogen encara més ponent. Altres estudis també descriuen que la ciclina D1 nuclear durant la fase S promou la incorrecta replicació del DNA que porta a una inestabilitat genòmica explicant la relació directa entre l'activitat aberrant del complex ciclina D1/CDK4, la regulació transcripcional i la inducció de danys a la cadena doble de DNA. Tot plegat porta cap a la inestabilitat genòmica necessària per la transformació neoplàsica. La sinergia entre l'expressió constitutiva de ciclina D1 nuclear i l'absència d'ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*), una cinasa implicada en la reparació del dany del DNA, ha estat descrita en models de ratolí. Els ratolins que no expressen ATM desenvolupen limfomes B i T de forma més accelerada que els ratolins control, i a més, els tumors mostren alteracions cromosòmiques que difereixen en les trobades en el ratolins control, predominantment involucrant el locus de MYC.(17, 18)

Tot i així, en limfòcits B, la desregulació de la ciclina D1 no sembla ser suficient per donar lloc a la transformació neoplàsica: es necessiten altres canvis genètics per tal d'assolir el procés oncogènic. Són diverses les proteïnes que han estat postulades com a candidates per cooperar amb la ciclina D1 en la promoció de la malignitat, incloent-hi els reguladors de cicle p16<sup>INK4α</sup> i CDK4, els gens reparadors i detectors de dany al DNA com ATM, p53 i p14<sup>ARF</sup> (producte d'un marc obert de lectura alternatiu del locus *CDKN2A*, que també codifica per p16<sup>INK4α</sup>) i components que formen part de la maquinària d'apoptosi com Bcl2-like 11 i Bcl2. S'ha publicat que el silenciament de la ciclina D1 a limfomes generats a ratolins amb limfòcits que sobreexpressen aquesta proteïna no produeix la mort de les cèl·lules tumorals, però sí que les sensibilitza davant l'apoptosi.(19)

En tumors sòlids sí hi ha evidències del paper de la ciclina D1 més enllà de la regulació del cicle cel·lular que encara no han estat ben caracteritzats en el MCL. Per exemple, està implicada en la regulació de la transcripció interactuant amb factors de transcripció, en el remodelat de la cromatina i actua sobre enzims reguladors d'histones. A més, la ciclina D1 també pot promoure inestabilitat cromosòmica en unir-se a gens que regulen la segregació cromosòmica. Un dels fets que fan pensar que la ciclina D1 té un rol important independent de la regulació del cicle cel·lular és que existeixen alguns casos de MCL que presenten la inactivació completa de *RB1* (retinoblastoma) mitjançant mutacions, fet que resulta en què la ciclina D1 deixi de desenvolupar la seva funció reguladora del cicle. Un dels possibles rols de la ciclina D1 podria estar relacionat amb el paper que s'ha descrit com a segrestadora de la proteïna proapoptòtica Bax en el citosol dels limfòcits, ja sigui de forma directa o bé mitjançant la inducció de l'acumulació intracel·lular de la xaperona Hsp70 (*Heat Shock Protein of 70 kDa*), a la que s'uneix Bax, tenint conseqüències negatives en la sensibilitat de les cèl·lules B al tractament.(6, 19, 20)

a. MCL ciclina D1 negatiu

Un petit percentatge de tumors (menys del 5 %) són ciclina D1 negatius i no presenten la típica translocació. Tot i així conserven el fenotip, el perfil d'expressió gènica i les alteracions genètiques característiques del MCL.(21)

Sovint, els casos de ciclina D1 negatius presenten sobreexpressió de la ciclina D2. Quan se silencia la ciclina D1 mitjançant *short hairpin RNA* (shRNA) les cèl·lules de MCL no experimenten efectes en la supervivència, i només hi ha una lleugera disminució de la proliferació augmentant les cèl·lules en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> i disminuint les de fase S. Aquests efectes moderats en silenciar la ciclina D1 són, almenys en part, probablement a causa dels mecanismes



compensatoris resultants de la sobreexpressió de ciclina D2 que es produeix en conseqüència. Com que el doble silenciament de la ciclina D1 i la ciclina D2 no intensifica els efectes observats únicament amb el silenciament de la ciclina D1 ja que segueix existint un procés oncogènic, no es pot afirmar que la tumorigenicitat vingui completament donada per la compensació a través de la ciclina D2. Les dades suggereixen que podrien estar involucrats mecanismes independents a les ciclines o bé anomalies genètiques secundàries que farien la ciclina D1 dispensable.(22, 23)

Un dels marcadors més útils per detectar casos de MCL tant positius per ciclina D1 com negatius és SOX11, que es troba present en totes dues poblacions.(24)

#### **v. Vies de senyalització alterades en el MCL**

Com ja s'ha comentat, la sobreexpressió de la ciclina D1 no és suficient per tal d'iniciar el procés oncogènic. Són altres alteracions secundàries les que provoquen el comportament tan agressiu de l'entitat. Aquestes alteracions impliquen mutacions en gens pel control del cicle cel·lular, així com en proteïnes de resposta al dany del DNA i en vies de supervivència, entre d'altres (Taula 1).

Taula 1. Selecció d'alteracions genòmiques recurrents en el MCL.(9)

Gen	Producte	Funció	Lesió
<b>Vies del control del cycle cel·lular i del dany al DNA</b>			
<i>CCND1</i>	Ciclina D1	Forma complexos amb CDK4/CDK6 per regular la transició G <sub>1</sub> /S a través de la fosforilació de Rb.	+
<i>CDK4</i>	Cinasa dependent de ciclina	Forma complex amb ciclins de tipus D per regular la fase primerenca de G <sub>1</sub> .	+
<i>MYC</i>	Oncogen	Indueix la proliferació cel·lular independent de mitògens.	+
<i>MDM2</i>	Regulador negatiu de p53	Ubiquitina ligasa E3 que indueix la degradació proteasomal de p53.	+
<i>RB1</i>	Supressor de tumors	S'uneix a E2F1, prevenint la seva translocació nuclear i la progressió del cycle cel·lular.	-
<i>CDKN2C</i>	Inhibidor de CDK p18 <sup>INK4C</sup>	Inhibeix l'activitat dels complexos ciclina D/CDK a G <sub>1</sub> .	-
<i>CDKN2A</i>	Inhibidor de CDK p14 <sup>ARF</sup> i p16 <sup>INK4α</sup>	Inhibeix l'activitat dels complexos ciclina D/CDK a G <sub>1</sub> .	-
<i>P53</i>	Supressor de tumors	Indueix parada de cycle cel·lular, apoptosi i senescència.	-
<i>ATM</i>	Ser/Thr cinasa	Controla els punts de control ( <i>checkpoints</i> ) G <sub>1</sub> /S i G <sub>2</sub> /M si hi ha dany en el DNA fosforilant p53, MDM1 i CHK2.	-
<b>Vies de senyalització</b>			
<i>SYK</i>	Tirosin cinasa	Involucrada en la senyalització del BCR, té importància en l'activació de les vies PKCβ, NF-κB i PI3K/Akt.	+
<i>PIK3CA</i>	Subunitat α catalítica de PI3K (p110α)	Promou la supervivència de les cèl·lules inclús amb senyalització del BCR deficient. Important en l'activació d'Akt.	+
<b>Apoptosi</b>			
<i>BCL2</i>	Regulador antiapoptòtic	Promou la supervivència segrestant Bax i Bak (proteïnes proapoptòtiques).	+
<i>BCL2L11</i>	Bim, <i>BH3-only protein</i>	S'uneix a Bcl-2, Bcl-X <sub>L</sub> i Mcl-1, actuant com a activador de l'apoptosi.	-

+ indica amplificació; -indica deleció o mutació

### a. Cicle cel·lular

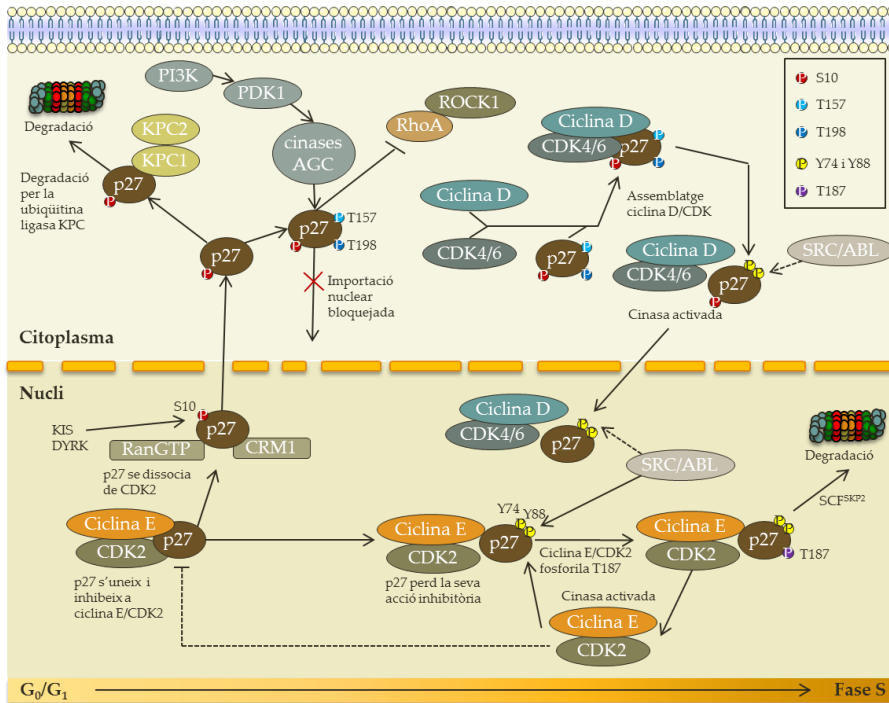
La progressió a través de les fases del cicle cel·lular (G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> i M) està sota el control de serina/treonina proteïna cinases. Aquestes cinases són heterodímers que consten d'una subunitat catalítica, la cinasa dependent de ciclina i una subunitat reguladora, la ciclina, que es necessita per tal que la CDK sigui activa. En condicions no tumorals, l'expressió de les CDK es manté constant durant el cicle i són les ciclins les que són sintetitzades i destruïdes a mesura que progressa el cicle cel·lular. En el MCL no només trobem alterat el cicle cel·lular a causa de l'expressió constitutiva de la ciclina D1. A més, dues de les més importants vies de senyalització implicades en el control del cicle cel·lular es troben sovint alterades en aquesta malaltia: p16<sup>INK4a</sup>/CDK4/RB1 i p14<sup>ARF</sup>/MDM2/p53. Totes dues vies es troben connectades mitjançant el locus *CDKN2A* (9p21), ja que aquest codifica tant per p16<sup>INK4a</sup>, un inhibidor de CDK, com pel regulador positiu de p53, p14<sup>ARF</sup> en humans o ARF (*Alternate Reading Frame*). Aquest locus es troba freqüentment deletat en el MCL. Existeixen altres elements d'aquestes vies com ara *TP53* o *RB1* que també es troben freqüentment alterats en aquesta malaltia. No tan sols això, sinó que s'han trobat altres mutacions que afecten gens com *CDK4*, *BMI1* o *MDM2* a causa d'amplificacions gèniques.(6, 25-28)

#### p27<sup>KIP1</sup>

Les CDK estan sotmeses a regulació negativa a partir de les proteïnes CKI (*CDK Inhibitory protein*). Existeixen dues famílies: les INK4 (*Inhibitors of CDK4*) i la família CIP/KIP (*CDK Interacting Protein/Kinase Inhibitory Protein*). La família INK4 comprèn p16<sup>INK4A</sup>, p15<sup>INK4B</sup>, p18<sup>INK4C</sup> i p19<sup>INK4D</sup>. Aquests inhibidors en condicions no tumorals s'uneixen a CDK4/6 inhibint la seva activitat cinasa i interferint en la seva associació a ciclins de tipus D. La

família CIP/KIP consta de tres membres: p21<sup>CIP1</sup>, p27<sup>KIP1</sup> i p57<sup>KIP2</sup>. Aquestes proteïnes s'uneixen en condicions normals a complexos ja formats de ciclina/CDK per inhibir-los. Una de les dianes més rellevants de l'oncogen MYC és p27<sup>KIP1</sup>. Una de les formes per les quals MYC accelera la proliferació cel·lular és a través d'antagonitzar la funció de p27<sup>KIP1</sup>.(27)

El rol de p27<sup>KIP1</sup> regulant l'activitat del complex ciclina D1/CDK és controvertit. Tot i que el paper de p27<sup>KIP1</sup> és d'inhibidor de complexos ciclina/CDK, en el cas del complex ciclina D1/CDK4 s'ha descrit una funció de factor d'assemblatge, sense inhibir el complex. Això pot ser perquè tant la ciclina D1, com CDK4 i CDK6 no tenen senyal de localització nuclear o NLS (*Nuclear Localization Signal*) i podria ser p27<sup>KIP1</sup> qui, en unir-se al complex, l'estabilitzaria i facilitaria el seu import nuclear. Si p27<sup>KIP1</sup> inhibeix el complex ciclina E/CDK2 però no inhibeix ciclina D1/CDK4, el segrest per part de la ciclina D1 de p27<sup>KIP1</sup> pot promoure l'entrada en fase S evitant que p27<sup>KIP1</sup> pugui inhibir el complex ciclina E/CDK2. Això suggereix que l'estequiometria podria ser important en l'acció de p27<sup>KIP1</sup> (Figura 5).(29-31)



**Figura 5. Model de les vies senyalització que regulen p27<sup>KIP1</sup>.** Durant el començament de G<sub>1</sub>, augmenta la fosforilació en Ser10, permetent l'exportació dependent de CRM-1 i la proteòlisi de p27<sup>KIP1</sup> citoplasmàtic intervinguda per KPC. ABL i SRC fosforilen p27<sup>KIP1</sup> durant aquesta fase contribuint a l'activació de ciclina E/CDK2, la fosforilació de Thr187 i la proteòlisi a través de SCF<sup>SKP2</sup>. Durant la meitat de la fase G<sub>1</sub>, PI3K (*Phosphoinositide 3-Kinase*) és activada i les cinases AGC fosforilen p27<sup>KIP1</sup> en la Thr157 i en la Thr198 per promoure l'assemblatge dels complexos ciclina D/CDK/p27<sup>KIP1</sup>. L'activació catalítica de ciclina D/CDK/p27<sup>KIP1</sup> requereix la fosforilació de tirosines en p27<sup>KIP1</sup>. La fosforilació de Thr198 per cinases AGC també promou la unió de p27<sup>KIP1</sup> a RhoA però bloqueja l'activació de RhoA-ROCK1 (*Rho-associated Coiled-coil-containing protein Kinase 1*), portant a una incrementada motilitat cel·lular. Aquest augment pot ocórrer només en el context de l'activació oncogènica de Ras/MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*)/p90<sup>RSK</sup> i de les cinases PI3K/AGC.(43)

Els nivells de p27<sup>KIP1</sup> oscil·len durant el cicle cel·lular, sent màxims durant la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> i mínims a la fase S. La seva regulació bàsicament està determinada per la seva degradació a través del sistema d'ubiquitinització. La degradació allibera els complexos de ciclina E/CDK2 de la seva acció negativa i es promou la proliferació. La degradació de p27<sup>KIP1</sup> requereix la

seva prèvia fosforilació a la treonina 187 (T187) en el C-terminal per part de CDK2 per tal que Skp2 (*S-phase kinase-associated protein 2*) la pugui reconèixer i portar-la al complex ubiquitina ligasa SCF (*Skp1-Cullin-F-box*) per la seva degradació.(32-34)

Tant la ciclina D1 com p27<sup>KIP1</sup> són proteïnes que es troben freqüentment alterades en línies tumorals i tumors primaris. Sabem que la ciclina D1, a més d'estar sobreexpressada en el MCL ho està també, per diversos mecanismes, en altres càncers com el de mama, bufeta i esòfag. El gen que codifica per p27<sup>KIP1</sup>, *CDKN1B*, es troba rarament mutat o deletat en tumors, però els nivells de la proteïna o la seva localització cel·lular sí es veuen normalment alterats. Vies generalment alterades en processos tumorals, com ara la de Ras/Raf/MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) o la de PI3K (*Phosphoinositide 3-Kinase*) fan disminuir els nivells de p27<sup>KIP1</sup>. S'ha descrit el paper de PKB (*Protein Kinase B*) (també anomenada Akt), fosforilant les treonines 157 i 198 de p27<sup>KIP1</sup> portant a la localització citoplasmàtica de l'inhibidor i, per tant, mantenint-lo allunyat de les dianes nuclears. A més, també s'ha descrit que aquestes fosforilacions activen la funció assembladora de la proteïna en els complexos ciclina D1/CDK4.(35-40)

També s'ha publicat que l'expressió de p27<sup>KIP1</sup> en el teixit limfoide no tumoral així com en nombroses neoplàsies limfoides de tipus no Hodgkin és inversament proporcional a l'índex de proliferació (determinat pel marcador Ki-67), confirmant la importància de l'inhibidor en la progressió del cicle cel·lular. De forma genèrica, els nivells proteïcs de ciclina D1 i p27<sup>KIP1</sup> mostren una relació inversa, que va acompanyada d'un pronòstic advers pel pacient.(41)

En el cas del MCL té lloc quelcom paradoxal a causa de, en part, l'excés de la ciclina D1. S'ha demostrat que en cèl·lules leucèmiques pro-B la inducció de

ciclina D1 promou la unió de p27<sup>KIP1</sup> als complexos ciclina D1/CDK4, però no afecta en la seva relocalització subcel·lular des del nucli cap al citosol. En el MCL, els casos més proliferatius (blastoides) i les línies cel·lulars expressen nivells més alts de p27<sup>KIP1</sup> que els casos clàssics, sent segrestada la major part de p27<sup>KIP1</sup> per la ciclina D1.(37, 42)

Cal destacar, a part, que p27<sup>KIP1</sup> citoplasmàtic regula altres mecanismes de forma independent a la seva funció reguladora de les CDK, com ara la migració cel·lular a través dels seus efectes sobre RhoA (*Ras homolog gene family, member A*) i l'estatmina. S'ha descrit que depenent del context cel·lular, p27<sup>KIP1</sup> pot regular la dinàmica del citoesquelet per tal de promoure o inhibir la motilitat cel·lular. La família Rho de GTPases, que inclou tres membres ben coneguts: RhoA, Rac1 i Cdc42, regulen la morfologia cel·lular, citocinesi i la motilitat cel·lular amb la seva participació en la reorganització dels filaments d'actina. L'activació de RhoA promou la formació de fibres d'estrès i les adhesions focals per tal d'augmentar l'adhesió cel·lular. La inhibició de la via de RhoA per tant, porta a una disminució d'aquestes fibres d'estrès i de les adhesions focals, fent incrementar la motilitat cel·lular i, en últim terme, facilitant la metastasi tumoral. En les cèl·lules MCF-7 de càncer de pit, la sobreexpressió de p27<sup>KIP1</sup> mutant que no expressa la senyal de localització nuclear fa que l'augment en p27<sup>KIP1</sup> citoplasmàtic comporti la reducció de l'activitat de RhoA així com un increment en la motilitat cel·lular. També en el cas de les cèl·lules de carcinoma hepatocel·lular, p27<sup>KIP1</sup> citoplasmàtic colocalitza amb les fibres d'actina per estimular la migració cel·lular a través de l'acció sobre la GTPasa Rac.(35, 43)

Altrament, en cèl·lules de fibrosarcoma i en fibroblasts normals p27<sup>KIP1</sup> també pot inhibir la migració cel·lular amb la seva unió a l'estatmina, una proteïna desestabilitzadora dels microtúbuls. Potser les diferències d'acció de p27<sup>KIP1</sup>

citoplasmàtic recauen en el tipus cel·lular, tot i que també pot tenir a veure en aquests resultats el tipus d'assaig de migració que s'ha fet servir en els diferents estudis.(44)

## MYC

Hi ha una proteïna que ha guanyat protagonisme en els darrers anys en l'estudi de la regulació del cicle cel·lular. Aquesta proteïna és MYC, un factor de transcripció oncogènic de la família de les *basic Helix-Loop-Helix (bHLH)*/cremallera de leucina. L'activació de MYC depèn de la formació d'un complex amb Max a través del domini de cremallera de leucines. És llavors quan gràcies al domini bHLH s'uneix a les seqüències de DNA anomenades *E-box*, a les regions reguladores dels gens que té com a diana i és on recluta la maquinària de coactivadors transcripcionals.(45)

La sobreexpressió de MYC està lligada a una proliferació incrementada i la disminució d'aquesta proteïna es relaciona amb l'entrada deficient a cicle i a l'aparició de cèl·lules en estat quiescent. MYC és capaç d'induir la proliferació cel·lular per diferents mecanismes: 1. La inducció de gens que codifiquen per CDK, on *CDK4* sembla ser la seva màxima CDK diana; 2. La inducció de gens codificants per ciclines; 3. La inducció d'activitat CAK (*CDK Activating Kinase*), cinases que fosforilen el CDK *T loop* per tal d'activar els complexos de ciclina/CDK; 4. La inducció de fosfatases de la família Cdc25, que s'encarreguen de mantenir desfosforilats dos residus propers al N-terminal, que si fossin fosforilats mantindrien inactivades les CDK; i 5. La repressió de la cinasa inhibidora de CDK, Wee1.(27)

S'ha observat que MYC també té una implicació significant en el metabolisme, regulant l'expressió de diversos gens del metabolisme de la glucosa com ara *LDHA*, *GLUT1*, *HK2*, *PFKM*, *ENO1* i *SLC16A1*, estimulants així el flux glucolític en les cèl·lules tumorals. A més, MYC també estimula la



biogènesi mitocondrial i regula l'expressió de gens mitocondrials en el genoma nuclear. Sembla que existeix una relació directa entre el fenotip glucolític impulsat per MYC en els tumors i la lactat deshidrogenasa A o LDHA (*Lactate Dehydrogenase A*), que regula la conversió de piruvat a lactat en la via glucolítica. Les cèl·lules transformades amb alteracions de MYC produeixen més lactat que les cèl·lules control. També animals transgènics que sobreexpressen MYC en el fetge presenten activitat enzimàtica glucolítica elevada en el fetge i sobreprodueixen lactat. El lactat produït per l'elevat flux glucolític en les cèl·lules tumorals és exportat fora de la cèl·lula mitjançant transportadors MCT (*Mono-Carboxylate Transporters*). Dades recents han confirmat que MYC regula l'expressió de *SLC16A1* (gen que codifica per MCT1) i *LDHA* en un model de ratolí transgènic E $\mu$ -MYC de limfoma B humà. Assajos d'immunoprecipitació de cromatina han demostrat que MCT1 és una diana directa de MYC en cèl·lules tumorals, i a més, nivells concomitants elevats de MCT1 i de mRNA de MYC són observats en entitats com el limfoma de Burkitt. A més de regular l'expressió de gens glucolítics, alguns estudis han demostrat que MYC regula el metabolisme de la glutamina mitjançant l'activació directa i indirecta de gens relacionats amb l'absorció i el metabolisme de glutamina. MYC activa la transcripció del transportador de glutamina ASCT2 i el *knockdown* de MYC redueix el consum de glutamina en línies cel·lulars de glioma. Estudis proteòmics en mitocondris de cèl·lules B P-493 que sobreexpressen MYC han demostrat que la glutaminasa mitocondrial GLS1 és induïda més de 10 vegades a través de MYC. GLS1 converteix glutamina en glutamat, que alhora és convertit en alfa-cetoglutarat que es farà servir en el cicle de Krebs. Altres anàlisis han revelat que els transportadors de glutamina ASCT2 i SLC7A25 també són dianes directes de MYC. A més, MYC regula el metabolisme de la glutamina mitjançant la repressió dels miRNA miR-23a i miR23b, que provoquen la

disminució de l'expressió de GLS1. Per tant, la supressió dels miRNA per MYC promou l'expressió de GLS1 i per tant, el metabolisme de la glutamina.(46, 47)

### Inhibició farmacològica de MYC

L'aproximació terapèutica de MYC és complicada, perquè encara que la seva expressió estigui relacionada amb molts tipus de càncer, la seva inhibició també comporta problemes: 1. En primer lloc, només en unes poques excepcions MYC està mutat tot i expressar-se de forma incrementada com a proteïna. Això fa que el desenvolupament de fàrmacs sigui més complex perquè no existeix distinció entre la proteïna *wild type* i la relacionada amb la promoció del desenvolupament tumoral; 2. En segon lloc, l'expressió de MYC és pràcticament universal en totes les cèl·lules en estat de proliferació, per tant la seva inhibició pot tenir una gran toxicitat en les cèl·lules no tumorals; i 3. Per últim, el disseny d'un bon inhibidor de MYC és complicat: les aproximacions més evidents, com atacar l'associació entre MYC i Max o altres cofactors és difícil perquè les superfícies on tenen lloc aquestes interaccions solen ser grans, uniformes i sense motius fàcils de reconèixer com els que sí es poden trobar en altres interaccions.(48)

Tot i les dificultats, MYC és una diana atractiva per combatre el càncer, per això, el desenvolupament de noves aproximacions per tal d'aconseguir modular la seva expressió és un gran tema d'estudi.

Quant a inhibidors de la interacció de MYC amb Max en trobem els inhibidors peptidomimètics, que van ser les primeres molècules petites descrites inhibidores de MYC que promouen la dissociació de les proteïnes de fusió MYC-CFP i Max-YFP recombinants i purificades fent servir un assaig basat en FRET. Els millors compostos trobats en el garbellat varen ser IIA6B17 i IIA4B20, dels quals posteriorment es varen derivar 120 anàlegs.

Dos d'aquests compostos, mycmycin-1 i mycmycin-2 van ser descrits com a altament específics i capaços de prevenir l'associació de les proteïnes recombinants MYC i Max.(49, 50)

En una aproximació més racional, basada en l'estructura molecular, es va trobar que els aminoàcids que es troben a les interfícies proteïna-proteïna com Trp, Tyr i His funcionen com "lectors de targetes" de manera que, si es fa servir una molècula plana o "targeta de crèdit"-like es podria bloquejar la interacció entre proteïnes. Tot i que l'objectiu era trencar el contacte entre MYC i Max, els resultats de les proves van indicar que el dímer seguia existint després de l'addició dels compostos inhibidors. Una possible explicació que es dona és que els inhibidors, tot i pertorbar l'estructura del dímer, no afecten prou per a evitar la unió al DNA.(49, 51)

En un altre garbellat es van identificar molècules petites inhibidores de la interacció MYC-Max que van ser identificats com Mycro1 i Mycro2, dos anàlegs que eviten aquesta heterodimerització. Diversos estudis *in vitro* van demostrar que tots dos compostos inhibien la proliferació de forma dosi-dependent en limfoma de Burkitt, en càncer de pit, en sarcoma osteogènic i en fibroblasts NIH3T3.(49)

Recentment, s'ha publicat una aproximació en què la inhibició de MYC es fa mitjançant un dominant negatiu induïble de MYC mutat, Omomyc, que competeix amb el MYC endogen i així inhibeix la transactivació dels gens que depenen de MYC. El seu mecanisme d'acció és a través del bloqueig de la dimerització de MYC amb Max inhibint la unió de MYC a la seva caixa E (*E-box*) consens. Experiments en ratolins expressant Omomyc transgènic creuats amb ratolins *LSL-Kras<sup>G12D</sup>* (un model de tumor de pulmó de cèl·lula petita) han mostrat esperançadors resultats, desapareixent els tumors en diferents estadis després de la inducció de l'expressió d'Omomyc durant 28

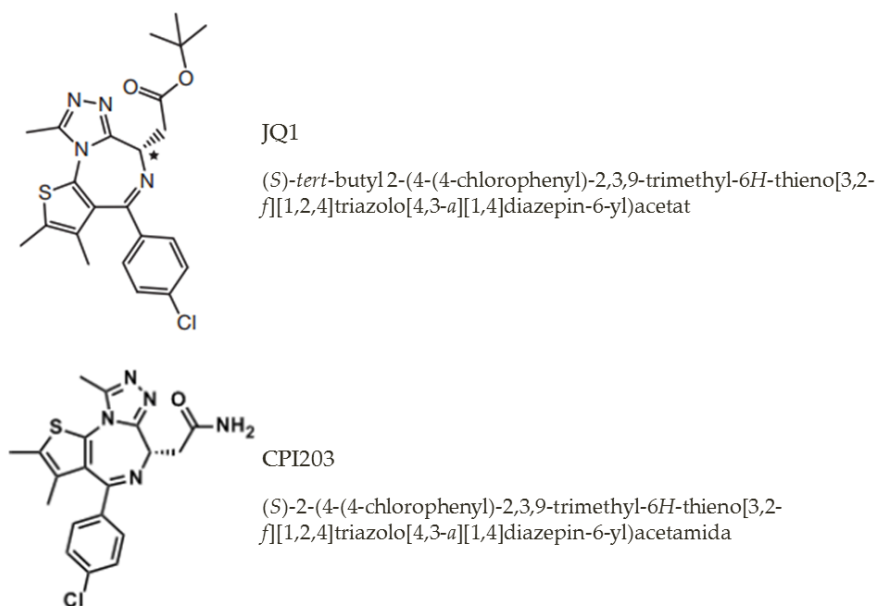
dies. A més, contràriament al que s'esperaria *a priori*, tot i la inhibició sistèmica de MYC només provoca efectes adversos lleus i ben tolerats en els teixits sans en proliferació.(52, 53)

Una altra de les opcions existents és fer servir els reguladors de la cromatina com a diana terapèutica, ja que estan desregulats en un nombrós grup de càncers. El punt desfavorable és que molts d'aquests estan expressats també en les cèl·lules sanes, i per tant, la seva inhibició comportaria efectes tòxics negatius. La inhibició d'alguns reguladors de la cromatina (com BRD4) ha mostrat ser selectiva per bloquejar la transcripció de gens oncogènics mestres com MYC. BRD4 és un membre de la família de proteïnes BET (*Bromodomain and Extra-Terminal domain*), on també trobem BRDT, BRD2 i BRD3. La família BET comparteix una arquitectura comú de dominis que comprèn dos bromodominis conservats en N-terminal, un domini extra-terminal i un C-terminal de reclutament més específic de cada proteïna. Aquestes proteïnes, amb bromodominis amb *acetyl-lysine binding pockets*, s'associen amb la cromatina acetilada i faciliten l'activació transcripcional. BRD4 està involucrat en el control de l'elongació per la RNA polimerasa II, reclutant el factor d'elongació positiu P-TEFb (*Positive Transcription Elongation Factor b*). Ja s'han desenvolupat inhibidors del bromodomini que formen ponts d'hidrogen amb el residu conservat d'asparagina de manera que es mimetitza la forma d'unió de la lisina acetilada i això resulta en la profunda unió de l'inhibidor al lloc d'unió però sense desplaçar les molècules d'aigua presents en el fons de l'*acetyl-lysine-binding cavity*. D'aquesta manera els inhibidors poden bloquejar de manera competitiva la unió de les lisines acetilades als bromodominis. Alguns dels inhibidors que pertanyen a aquest grup són les thienodiazepines com JQ1 o CPI203, les benzodiazepines com GW841819X o I-BET762, la benzotriazepina BzT 7 o els isoxazols com isoxazol 4d57 i isoxazol 9, entre d'altres. Un dels compostos més estudiats

fins a la data és el JQ1 (sent només actiu l'enantiòmer (+)-JQ1), que s'uneix al bromodimini amino-terminal de BRD4, desplaçant la proteïna BET de la cromatina. S'ha descrit que BRD4 ocupa preferentment *enhancers* (amplificadors genètics) i *super-enhancers* en cèl·lules canceroses, incrementant l'expressió de gens ja prèviament seleccionats per ser sobreexpressats. Per tant, s'ha proposat que la inhibició de BRD4 a través de JQ1 disminueix de manera preferent l'expressió d'oncogens que han estat altament seleccionats en funció del tipus de càncer. Un dels exemples més clars és MYC, que està sobreexpressat en moltes neoplàsies, incloses les hematològiques. En teoria, JQ1 ha de ser un inhibidor ineficient en els casos en què MYC està sota el control de promotors exògens que no actuen a través dels llocs d'unió de BRD4, com els associats a alguns amplificadors genètics d'immunoglobulines o a seqüències del virus del papil·loma. Aquests inhibidors han mostrat inhibició selectiva de MYC en un ampli ventall de tumors, com en la leucèmia mieloide aguda, en mieloma múltiple o en la leucèmia limfoblàstica aguda. En el cas de la leucèmia mieloide aguda un estudi va demostrar que 13 de les 14 línies cel·lulars i 15 de les 18 mostres primàries testades van ser sensibles a JQ1. El tractament amb JQ1 va promoure la inducció d'apoptosi i/o de maduració monocítica. Aquelles cèl·lules tractades amb JQ1 van mostrar una regulació positiva de gens específics de macròfags i una disminució de l'expressió de gens marcadors de cèl·lules mare leucèmiques. Com s'esperava, també es va trobar una disminució en els transcrits de MYC i també en els nivells de la proteïna. En el mieloma múltiple, altres estudis sobre els efectes de JQ1 han determinat que aquesta entitat és altament sensible a la inhibició de BRD4, probablement perquè l'expressió d'aquest està altament correlacionada amb la progressió de la malaltia i perquè el locus de BRD4 es troba freqüentment amplificat en aquesta entitat. 23 de 25 línies cel·lulars de mieloma múltiple van demostrar

una alta sensibilitat a JQ1, que va ser discretament modificada en cocultivar aquestes cèl·lules amb cèl·lules estromals de medul·la òssia (quelcom que normalment confereix resistència davant els agents quimioteràpics). També s'han dut a terme estudis en leucèmia limfoblàstica aguda, la neoplàsia hematològica més freqüent durant la infància. 9 línies cel·lulars amb diferents aberracions cromosòmiques van mostrar sensibilitat al fàrmac i el tractament va induir apoptosi i una posterior parada de cicle. Com en la leucèmia mieloide aguda, JQ1 va produir un ràpid desplaçament de BRD4 del promotor de *MYC* i la disminució del RNA missatger d'aquest així com dels nivells de proteïna.(49, 54-62)

Un altre compost d'interès inhibidor de la unió entre BRD4 i les histones acetilades és el CPI203, un fàrmac derivat de JQ1 (Figura 6). Es tracta d'un fàrmac selectiu, potent i inhibidor competitiu de les proteïnes amb dominis BET. *In vitro*, és capaç d'inhibir la producció d'IL-6 induïda per lipopolisacàrid (LPS) en cèl·lules de leucèmia monocítica aguda i la producció de RNA missatger de *MYC* en cèl·lules de limfoma de Burkitt. Els nivells de *MYC* disminueixen després 4 hores de tractament, portant a l'aturada de cicle i l'apoptosi. *In vivo*, CPI203 presenta un 84 % de biodisponibilitat oral. En un model de xenotrasplantament de leucèmia mieloide aguda, el tractament amb CPI203 va inhibir la producció de *MYC*, tant en l'àmbit proteic com de RNA missatger, disminuint el creixement tumoral i promovent l'apoptosi tumoral.(63-65)



**Figura 6. Estructura química dels compostos (+)-JQ1 i CPI203.** Estructura química del (+)-JQ1 i del CPI203, dues thienotriazolodiazepines relacionades estructuralment que inhibeixen la unió entre les histones acetilades i la proteïna BRD4.(55, 63, 64)

D'altra banda, també l'ús de les vies metabòliques alterades per MYC com a diana terapèutica pot obrir les portes cap a noves estratègies per tractar els tumors on MYC té un paper important. Per una banda, LDHA s'ha presentat com una diana potencial per inhibir el creixement tumoral de tumors amb una taxa glucolítica elevada a causa de MYC. En els darrers anys s'han desenvolupat una sèrie d'inhibidors de LDHA, alguns dels quals han demostrat disminuir la producció de lactat en sistemes cel·lulars. També s'han desenvolupat inhibidors de MCT1 que aconseguixen inhibir el creixement de línies cel·lulars tumorals tant *in vitro* com en models de xenotrasplantament *in vivo*. La inhibició de MCT1 disminueix la proliferació de la línia cel·lular Raji de limfoma de Burkitt *in vitro*, i també inhibeix *in vivo* el creixement de tumors generats per xenotrasplantament d'aquesta línia. Per últim, també en trobem inhibidors de GLS1, com BPTES, que inhibeix el creixement de les cèl·lules P493 sota condicions aeròbiques i indueix la mort

cel·lular en condicions d'hipòxia. No només això, sinó que també *in vivo* aconsegueix reduir el volum dels tumors generats per xenotrasplantament. Estudis recents han identificat un inhibidor encara més potent de la glutaminasa, el CB-839, que ha demostrat eficàcia antiproliferativa contra un panel de línies cel·lulars de càncer de pit.(46, 47)

#### **IRF4**

El factor de transcripció IRF4 (*Interferon Regulatory Factor 4*) forma part de la família IRF, que comprèn una sèrie de factors de transcripció. IRF4 té restringida la seva expressió en el sistema immune, propietat que comparteix amb un altre membre de la família, IRF8. Tant IRF4 com IRF8 estan involucrats en el desenvolupament de cèl·lules limfoides, mieloides i dendrítiques. Al contrari que altres membres de la família IRF, IRF4 no és induït per interferó, però sí per altres estímuls mitogènics, com ara senyals antígen-receptor, lipopolisacàrids i la senyalització per CD40. Aquests estímuls comporten l'activació dels heterodímers de NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*). A més, la transcripció d'IRF4 també pot ser activada per la citocina IL-4, implicant el factor de transcripció STAT6 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 6*) i la seva activació. Els nivells d'IRF4 varien en el sistema hematopoètic en funció del llinatge i de l'estadi en què es troba la cèl·lula. En cèl·lules B madures, l'expressió d'IRF4 és reprimida pel factor de transcripció Mitf (*Microphthalmia-associated transcription factor*). Les cèl·lules B que es troben en el centre germinal tenen nivells baixos d'IR4, mentre que els nivells més alts de la proteïna es troben en les cèl·lules plasmàtiques completament diferenciades. Per tant, IRF4 és necessari durant la resposta immune dels limfòcits per la seva activació i la generació de cèl·lules plasmàtiques secretores d'immunoglobulines.(66-69)



En el cas de molts gens, IRF4 funciona com a regulador positiu de la transcripció fent ús del domini de transactivació C-terminal. En altres casos, IRF4 pot reprimir l'expressió d'alguns gens induïbles per interferó unint-se als elements de resposta estimulats per interferó o ISRE (*Interferon Stimulated Response Elements*) i també pot reprimir altres gens com *BCL6*, per mecanismes encara no coneguts. IRF4 és un regulador essencial en molts estadis de la diferenciació de les cèl·lules B. Tant IRF4 com IRF8 són necessaris per regular la transició pre-B. IRF4 també té un paper fonamental en la resposta adaptativa de les cèl·lules B madures. A més, també és necessari pel canvi d'isotip d'immunoglobulina. Fora del llinatge B, IRF4 té un rol important en diversos estadis de la diferenciació de les cèl·lules T i de les cèl·lules mieloides. IRF4 és un regulador crític en la diferenciació dels limfòcits T cooperadors, controlant l'expressió de citocines i l'apoptosi. I tant IRF4 com IRF8 controlen la diferenciació de diverses poblacions de cèl·lules dendrítiques. En el llinatge mieloides, IRF4 interfereix amb la senyalització dels TLR (*Toll-Like Receptors*) competint amb IRF5 per la unió a la proteïna MYD88.(67)

Quelcom recurrent en la patogènesi de les neoplàsies limfoides de cèl·lula B és el paper que tenen alguns factors de transcripció per actuar com a oncogens quan es desregulen ja sigui per translocacions cromosòmiques, amplificacions o mutacions. En el cas d'IRF4, les cèl·lules tumorals poden ser dependents d'aquest factor de transcripció inclús en absència d'alteracions en el seu locus; encara que s'han trobat mutacions en casos rars de mieloma múltiple o MM (*Multiple Myeloma*) on el gen d'IRF4 es troba sota el control de les regions reguladores de la cadena pesada de les immunoglobulines i també en limfomes de cèl·lules T, a causa de translocacions cromosòmiques. En el cas del subtipus ABC (*Activated B-Cell-like*) del limfoma B difús de cèl·lula gran o DLBCL (*Diffuse Large B-Cell Lymphoma*), que presenta activació

constitutiva de la via de NF- $\kappa$ B, l'expressió d'IRF4 ve donada precisament per aquesta activitat constitutiva de la via. En contrast, el subtipus GCB (*GC B-Cell-like*) presenta nivells baixos d'IRF4 i també una baixa activitat de la via NF- $\kappa$ B.(67)

#### Inhibició farmacològica d'IRF4

Per norma general, els factors de transcripció són considerats difícils dianes terapèutiques. Tot i així, la recerca per aconseguir molècules inhibidores de factors de transcripció com IRF4 no s'atura. El fet que existeixi una autoregulació d'IRF4, unint-se al seu propi promotor, suscita una gran oportunitat terapèutica, ja que la disminució de l'expressió de la proteïna IRF4 també disminuiria la seva transcripció de forma secundària. De moment, l'inhibidor de proteïna cinasa C beta, enzastaurin, ha mostrat activitat antiproliferativa i proapoptòtica en MM i disminueix de manera coordinada l'expressió d'IRF4 i també de MYC, a causa de l'estreta relació entre totes dues proteïnes. Una aproximació *a priori* factible, podria ser actuar sobre la família de proteïnes PU.1 i SPIB, de la família ETS de *DNA-binding factors* que s'expressen en alguns models com el ABC-DLBCL. La interacció amb PU.1 requereix la fosforilació d'aquest en una serina del domini PEST (seqüència rica en prolina, àcid glutàmic, serina i treonina) de la proteïna que també està conservada en SPIB. Per tant, el desenvolupament d'inhibidors de cinases que bloquegin aquesta fosforilació podria ser una bona opció farmacològica. Una darrera opció seria actuar sobre proteïnes que produeixen canvis conformacionals en IRF4, com FKBP52, de la família de les immunofilines. FKBP52 és una peptidil-prolyl isomerasa que s'associa a un domini ric en prolines d'IRF4. FKBP52 altera l'habilitat d'IRF4 per unir-se al DNA i per tant, de què activi la transcripció dels seus gens diana. Fàrmacs

inhibidors de FKBP52 com l'ascomicina, augmenten la funció d'IRF4, per tant confirma l'oportunitat terapèutica en aquesta interacció.(67)

### **La relació entre MYC i IRF4**

L'expressió d'IRF4 augmenta tant a les cèl·lules plasmàtiques com en el mieloma múltiple, però MYC està elevat només en el cas de les cèl·lules mieloides. Sembla que IRF4 actua com un regulador mestre i comparteix moltes de les seves dianes (cicle cel·lular, mort cel·lular, regulador de la transcripció...) amb MYC. L'estudi de la relació entre totes dues proteïnes revela que en el cas del mieloma múltiple totes dues reforcen la seva expressió de manera recíproca. IRF4 s'uneix de manera directa al promotor de MYC i activa la seva expressió. Alhora, MYC transactiva *IRF4* unint-se a una regió intrònica conservada, fomentant la retroalimentació autoregulatora. L'expressió de MYC en cèl·lules de MM és anòmla, ja que les cèl·lules plasmàtiques no expressen MYC a causa de la repressió per Blimp-1 (*B-lymphocyte-induced maturation protein 1*) (també anomenada PRDM1 (*PR Domain zinc finger protein 1*)). Però MYC està freqüentment augmentat en MM, ja sigui per una translocació o per una amplificació, el que porta a augmentar tants els nivells de MYC com d'IRF4. En general, les cèl·lules de MM no tenen lesions genètiques en el locus d'*IRF4*, però creen una dependència cap aquest factor de transcripció com a resultat de les seves anormalitats genètiques i biològiques.(67, 70)

### **b. Vies de resposta al dany del DNA**

També es troben aberracions cromosòmiques en consonància amb la desregulació en la resposta al dany del DNA en el MCL. La proteïna cinasa ATM es troba involucrada de manera crítica en la resposta al dany al DNA i pot actuar com a gen supressor de tumors. El gen *ATM*, que es troba a 11q22-23 es troba freqüentment deletat i mutat, sobretot en aquells casos amb

inestabilitat genòmica incrementada. S'han trobat mutacions en *ATM* en el domini PI3K i aquestes són freqüentment acompanyades per la pèrdua de l'altre al·lel. L'elevada freqüència de mutacions d'aquest gen en el MCL ha estat relacionada amb l'expressió d'*ATM* en les cèl·lules B verges en la zona del mantell del gangli limfàtic. Un altre mecanisme considerat per explicar aquesta alta freqüència és l'inici aberrant de la replicació del DNA durant la fase S del cicle cel·lular, portant a l'aparició de trencaments en les dues cadenes de DNA i per tant, a l'activació de la via d'*ATM*. No només aquesta proteïna, sinó altres més inferiors a la via com ara *CHK1* i *CHK2*, dues proteïnes serina/treonina cinases, es troben ocasionalment mutades en casos de MCL amb alta inestabilitat cromosòmica. A part de ser un gen clau del cicle cel·lular, el gen supressor de tumors *TP53*, juga un paper important davant el dany al DNA. Mutacions en aquest gen, normalment en conjunció amb delecions de 17q13, van ser detectades inicialment en casos de MCL blastoide. Un altre mecanisme que també esdevé en la disrupció de la via de p53 és la sobreexpressió dels reguladors negatius *MDM2* i *MDM4*. La sobreexpressió de *MDM2* per augment en número de còpies es correlaciona amb una supervivència reduïda. Quelcom similar ocorre amb *MDM4*, que quan és altament expressat en el MCL disminueix l'expressió de l'inhibidor de CDK p21<sup>CIP1</sup>, promovent la progressió del cicle cel·lular. Recentment també s'ha descrit una alta expressió de la proteïna serina/treonina cinasa *PIM1*, que estabilitza *MDM2*.(5, 6, 9, 71)

### **c. Vies de supervivència cel·lular**

A més de presentar una proliferació descontrolada, també la supervivència cel·lular està alterada en el MCL. Diferents estudis descriuen la sobreexpressió de *BCL2*, un gen antiapoptòtic localitzat en 18q21. *Mcl-1* (*Myeloid cell leukemia-1*) és també comú en els tumors més agressius i pot ser

augmentat per la senyalització d'Akt/mTOR (*Mammalian Target Of Rapamycin*). Existeixen casos de sobreexpressió de Bcl-X<sub>L</sub> lligada a l'activació constitutiva de la via NF-κB. Finalment, la proteïna proapoptòtica del tipus BH3-only Bim es troba freqüentment inactivada a causa de delecions genòmiques en el gen *BCL2L11*. S'han descrit delecions homozigòtiques del locus *BCL2L11* en les línies cel·lulars de MCL JeKo-1, Z-138, UPN-1, SP-49 i SP-53 i les immunohistoquímiques realitzades a partir d'*arrays* de teixit mostren l'absència de Bim en el 32 % de les mostres de tumors primaris.(9, 72, 73)

#### **d. Vies implicades en la interacció amb el microambient**

El microambient té un paper fonamental en el MCL. Més enllà de les anomalies intrínseques de les cèl·lules tumorals, aquestes també reben molts senyals externes que promouen el seu creixement i disseminació. Tant els limfòcits B normals com els tumorals tenen regulats el seu creixement i la seva disseminació a través de molts factors exògens que requereixen contacte amb cèl·lules accessòries. De fet, les cèl·lules tumorals entren en apoptosi espontània *in vitro*, el que fa pensar en la importància dels senyals que reben des del microambient i que afecten la proliferació i la supervivència.(74)

Entre els tipus cel·lulars que formen part del microambient tumoral del MCL en trobem: 1. Les cèl·lules mesenquimals estromals del moll de l'os o BMSC (*Bone Marrow Stromal Cells*): són capaces de promoure la supervivència i la proliferació dels limfòcits malignes *ex vivo*. Assajos de cocultiu amb cèl·lules de MCL han mostrat un augment en l'adhesió i la migració dels limfòcits, en part, a través de l'expressió de CXCR4, CXCR5 (*C-X-C chemokine Receptor type 4 and 5*) i de VLA-4 (*Very Late Antigen-4* o integrina α4β1) i un augment de la resistència a fàrmacs, associada a la disminució de l'expressió de BAFF (*B-cell Activating Factor*) i de l'activació de la via de NF-κB i una resposta realçada a

les quimiocines CXCL12 i CXCL13 (*chemokine (C-X-C motif) Ligand 12 and 13*). Els limfòcits tumorals tenen una gran afinitat per les BMSC, però l'adhesió pot ser inhibida per anticossos anti-VLA-4 o bé amb antagonistes de CXCR4;

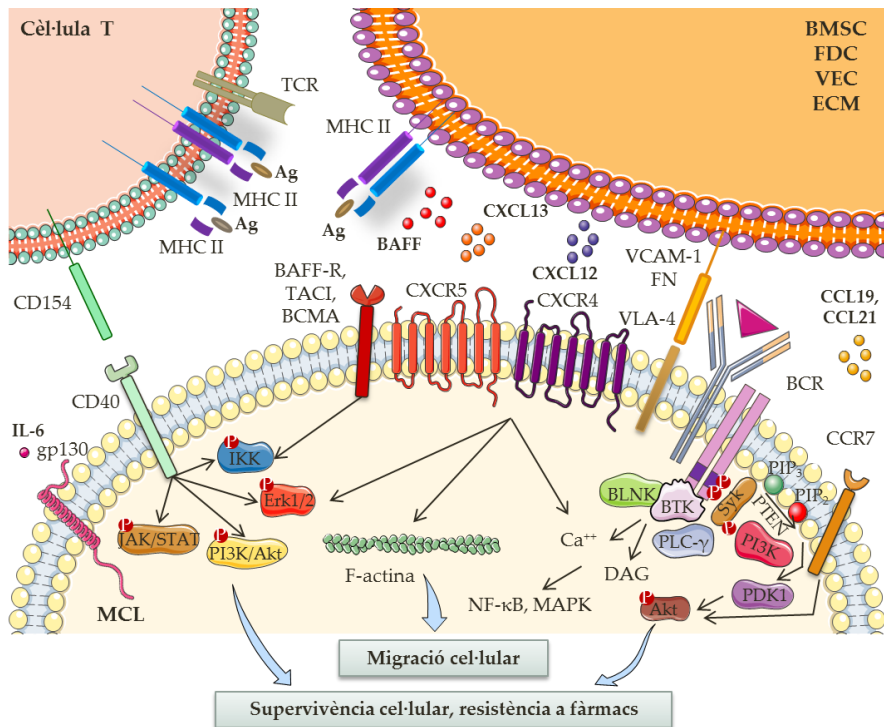
2. Les cèl·lules dendrítiques fol·liculars o FDC (*Follicular Dendritic Cells*): juguen un paper important en la iniciació i manteniment de la resposta immunitària. Permeten la migració, selecció i diferenciació de les cèl·lules B a partir de diferents factors de supervivència, que inclouen la senyalització del BCR, quimiocines i citocines i molècules d'adhesió. Les FDC tenen un important rol en l'estimulació per antígen en les neoplàsies de cèl·lula B. La presentació de l'antigen portada a terme per les cèl·lules mielomonocítiques (incloses les FDC) és una forma alternativa d'alliberar antígen de forma independent a les cèl·lules T. En el MCL la distribució difusa de les FDC podria estar associada a un pitjor pronòstic. Sembla que la inhibició de l'apoptosi que té lloc quan les cèl·lules de MCL s'adhereixen a les FDC està relacionada amb la disminució dels nivells de la proteïna proapoptòtica Bim, que es troba regulada postranscripcionalment via l'augment del microRNA-181a. També es veu inducció de la histona desacetilasa 6 o HDAC6 (*Histone Deacetylase 6*), així com una activació de MYC i la disminució de miR-548m;

3. Monòcits i macròfags: un nombre elevat de macròfags es relaciona amb una malaltia més agressiva i amb un major nombre de mitosis. Un recompte absolut de monòcits elevat es correlaciona amb una pitjor evolució del MCL;

4. Cèl·lules T: l'expressió de CD40 i la resposta al seu lligand (CD154) suggereix que les cèl·lules de MCL interaccionen amb les cèl·lules T CD154<sup>+</sup> en els teixits, i que aquesta interacció pot promoure la supervivència i l'expansió dels limfòcits tumorals.(74-83)

Algunes de les vies moleculars que el limfòcit fa servir per mantenir el contacte amb el microambient són el BCR, l'activació de CD40 i altres membres de la superfamília de receptors TNF (*Tumor Necrosis Factor*)

(TNFRSF13B/TACI (*Transmembrane Activator and CAML Interactor*), TNFRSF17/BCMA (*B Cell Maturation Antigen*) i TNFRSF13C/BAFF-R), l'activació per receptors Toll-like (TLR) i per diversos receptors de citocines i quimiocines (com IL-6) i molècules d'adhesió. Recents estudis sobre el BCR recolzen la implicació de la selecció d'antigen en la patogènesi del MCL, almenys en un subgrup de pacients, suggerint un paper en l'expansió de cèl·lules clonals tumorals. Algunes cinases del BCR com Syk, Lyn i Btk s'han trobat fosforilades en mostres primàries de MCL, suggerint un rol important del BCR en el manteniment i la progressió de la malaltia. Estudis del perfil d'expressió gènica comparant cèl·lules de MCL amb cèl·lules B normals van revelar una elevada expressió de gens de la superfamília del TGF $\beta$  (*Transforming Growth Factor beta*) i gens involucrats en les vies WNT, PI3K/Akt, TNF i NF- $\kappa$ B en el cas dels limfòcits B tumorals. En comparació amb altres limfomes, com el limfoma fol·licular, els estudis en el MCL són menys clars sobre el rol del microambient. Tot i així, l'activació de vies de senyalització relacionades amb senyals externs com el BCR o PI3K/Akt en absència de mutacions activadores fa pensar que el microambient juga un paper important en la patogènesi del MCL (Figura 7).(74, 84-90)



**Figura 7. Senyalització mitjançant quimiocines i citocines entre la cèl·lula B i el microambient tumoral.** El contacte entre les cèl·lules de MCL i les cèl·lules estromals mesenquimals derivades de la medul·la òssia (BMSC), cèl·lules fol·liculars dendrítiques (FDC), cèl·lules vasculars endotelials (VEC) i la matriu extracel·lular (ECM) està establert i mantingut per receptors de quimiocines i molècules d'adhesió. Les cèl·lules BMSC, FDC i VEC atreuen les cèl·lules de MCL a través de receptors de quimiocines acoblats a proteïnes G (CXCR4, CXCR5). Les integrines VLA-4 cooperen amb els receptors de quimiocines en l'adhesió i la retenció al teixit a través de la unió als seus respectius lligands (VCAM-1). Les BMSC i les FDC també expressen BAFF, un membre de la família TNF que proporciona senyals de supervivència a les cèl·lules de MCL a través dels corresponents receptors (BCMA, TACI, BAFF-R). Les cèl·lules T interaccionen amb les cèl·lules de MCL amb CD154, el lligand de CD40, iniciant les vies de Erk1/2, PI3K/Akt, JAK (*Janus Kinase*)/STAT i promouent la senyalització de supervivència. L'estimulació del receptor de la cèl·lula B (BCR) recluta i activa Syk i Btk i promou la consegüent activació de la via PI3K/Akt. Tot plegat, aquesta interacció entre les cèl·lules de MCL i les cèl·lules accessòries resulta en l'activació de vies de supervivència i de resistència a fàrmacs (*adaptat de Roué G et al, pendent de publicació*). (74, 89)



Les cèl·lules de MCL tenen propensió a disseminar-se i fer recirculació (*homing*) en diferents compartiments. Els limfòcits són atrets en els teixits en resposta a gradients de quimiocines provinents de les cèl·lules estromals, tenint aquestes proteïnes un paper rellevant en la interacció dels limfòcits amb l'entorn. El tràfic cel·lular entre la sang i els teixits limfàtics està regulat per aquestes molècules. Els limfòcits que circulen en sang interaccionen amb les cèl·lules vasculars endotelials o VEC (*Vascular Endothelial Cells*) a través de molècules d'adhesió com selectines i integrines. Aquest procés és conegut com a *rolling*, que forma part del *homing*. Les quimiocines que es troben a la superfície endotelial activen les integrines, de forma que es produeix una migració transendotelial cap als teixits gràcies al gradient de quimiocines. Les cèl·lules neoplàsiques de MCL expressen alts nivells de receptors com CXCR4 i CXCR5, dos receptors de quimiocines, i de molècules d'adhesió com la integrina VLA-4 (Taula 2).(74, 75, 91)

**Taula 2. Receptors de quimiocines i molècules d'adhesió en el MCL.(74)**

Receptor	Lligands	Expressió en MCL	Funció
CXCR4	CXCL12	Alta	Organogènesi, limfopoesi, hematopoesi, migració cel·lular i supervivència, angiogènesi.
CXCR5	CXCL13	Alta	Migració de la cèl·lula B, resposta a limfòcits T cooperadors (Th2), organogènesi.
CCR7	CCL19, CCL21	Intermèdia-alta	Desenvolupament de la cèl·lula T en el timus, <i>homing</i> en el node limfàtic de cèl·lules T verges i reguladores i de cèl·lules dendrítiques.
VLA-4	VCAM-1, fibronectina	Intermèdia-alta	Adhesió dels limfòcits a l'endoteli i a les cèl·lules estromals, transducció de senyals cel·lulars.
LPAM-1	Addressina	Baixa o intermèdia-alta	<i>Homing</i> dels limfòcits normals a la mucosa gastrointestinal.

Com hem dit abans, a més a més d'un paper en el tràfic i *homing* cel·lular, les interaccions amb el microambient també ofereixen a les cèl·lules B tumorals senyals de supervivència i de resistència a fàrmacs. La interacció entre el MCL i l'estroma afavoreix el desenvolupament de malaltia mínima residual després de la quimioteràpia, quelcom que fa prioritari trobar un mecanisme amb què trencar aquesta interacció. Això pot ser aconseguit des de dos vessants: o bé atacar les molècules de senyalització activades a les cèl·lules de MCL com a conseqüència de la interacció amb el microambient (Syk, Btk, PI3K) o bé intentant que les cèl·lules de MCL no es mobilitzin bloquejant els receptors de *homing* (receptors de quimiocines i molècules d'adhesió).(74)

#### **vi. Pronòstic**

Alguns estudis han mostrat que els principals paràmetres relacionats amb un pronòstic desfavorable de la malaltia són un incrementat nivell de proliferació, un alt valor del MIPI (*MCL International Prognostic Index*) i la morfologia blastoide. Una puntuació elevada en el MIPI o una alta proliferació poden ser eines útils per tal de discriminar pacients amb un curt temps de supervivència. Tot i això, aquests paràmetres són poc emprats a la clínica, decantant-se, en general, per iniciar un tractament intens en el moment del diagnòstic per tal de contrarestar el pobre pronòstic de la malaltia.(92)

#### **vii. Tractaments actuals**

##### **a. Quimioteràpia convencional**

Atès el pronòstic desfavorable de la malaltia i que la teràpia actual no és curativa, si els pacients són asimptomàtics o bé són d'avançada edat, una opció a considerar és "esperar i observar". Quan la malaltia fa que el tractament sigui inevitable, la quimioteràpia convencional és una de les

opcions disponibles. Dins de la quimioteràpia en trobem diferents tipus de molècules. Les principals serien: 1. Els antimetabòlits, que actuen com anàlegs de molècules necessàries per la cèl·lula, impedit la replicació del DNA i RNA. La fludarabina en forma part d'aquest grup, sent un anàleg de l'adenosina deaminasa. També és un antimetabòlit el metotrexat, sent anàleg de l'àcid fòlic i la citarabina, anàleg de pirimidines; 2. Els agents alquilants, que actuen durant tot el cicle cel·lular danyant directament el DNA (com la ciclofosfamida); 3. Antibiòtics antitumorals, com les antraciclina, que afecten els enzims implicats en la replicació del DNA. La doxorubicina és un tipus d'antraciclina; 4. Complexos de platí, que destrueixen les cèl·lules malignes de forma semblant a com ho fan els agents alquilants; 5. Els alcaloides vegetals, derivats de les plantes, com serien els inhibidors de la vinca (com la vincristina) o els taxans, que són agents antimicrotubulars; i 6. Els inhibidors de la topoisomerasa, enzims necessaris per la replicació del DNA, com l'irinotecan (inhibidor de la topoisomerasa I), entre d'altres.(2, 11)

En el tractament del MCL podem dividir els règims de quimioteràpia en tres categories: 1. Els règims que contenen doxorubicina, com CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina i prednisona), probablement el més utilitzat, o R-CHOP, en què s'afegeix el rituximab, un anticòs monoclonal anti-CD20; 2. Els règims de quimioteràpia amb combinacions intenses incloent antimetabòlits, com R-hyper-CVAD, en què es combina el rituximab amb el hyper-CVAD, un tractament semblant a CHOP en què s'afegeix metotrexat i citarabina; i 3. Els règims basats en anàlegs de les purines com R-FCM (fludarabina, ciclofosfamida i mitoxantrona).(11, 93)

En el cas de pacients joves, la teràpia de trasplantament amb cèl·lules mare hematopoètiques pot ser considerada. L'aplicació de règims intenses de quimioteràpia en primera línia i el trasplantament autòleg de cèl·lules mare

ha millorat la mediana de supervivència, arribant a 7 anys. En comparació amb el trasplantament autòleg, el trasplantament al·logènic de cèl·lules mare és menys comú en el MCL i, tot i que alguns estudis prospectius apunten cap a una eficàcia significativa, també hi ha altres estudis que mostren pobres resultats. Tant en el cas del trasplantament autòleg com en l'al·logènic es requereixen més estudis addicionals per tal d'extreure conclusions pel tractament del MCL.(94, 95)

Des de la introducció en la dècada dels seixanta dels anàlegs de nucleòsids, aquests han esdevingut un dels tractaments més freqüentment utilitzats i amb una millor activitat antitumoral. Fins al moment, han estat diversos els anàlegs de nucleòsids emprats en la pràctica clínica, cadascú amb diferent eficàcia a causa que el MCL és un dels limfomes amb una inestabilitat cromosòmica més elevada, principalment causada per defectes en la maquinària de reparació del DNA. El clorhidrat de bendamustina o simplement bendamustina, un agent anticancerós desenvolupat en la dècada dels seixanta. Es tracta d'una molècula que combina tant la funció d'antimetabòlit dels anàlegs de purina com la funció alquilant. El seu mecanisme d'acció recau en la competició per ser incorporada en el DNA i en la inhibició de la ribonucleòtid reductasa, un enzim encarregat del reciclatge de nucleòtids. La seva acció alquilant es basa en la inducció de ruptures tant en una com en les dues cadenes de DNA. Tot plegat comporta el bloqueig de l'elongació de la cadena de DNA, la inhibició de la seva síntesi i una interferència en els mecanismes de reparació d'aquesta, induint la mort cel·lular per apoptosi. Recentment s'han publicat resultats prometedors de la bendamustina amb el rituximab en el tractament del MCL. Un estudi en fase III on es compara R-CHOP versus rituximab suggereix que no hi ha efectes inferiors en el braç de rituximab, mostrant un perfil tòxic més favorable,

especialment en el cas de les complicacions infeccioses, la leucocitopènia i l'alopecia.(96-98)

#### **b. Noves aproximacions**

El coneixement més gran dels mecanismes biològics implicats en la malaltia han permès el desenvolupament de noves teràpies, especialment indicades en els casos de recaigudes i pacients refractaris.

#### **Bortezomib**

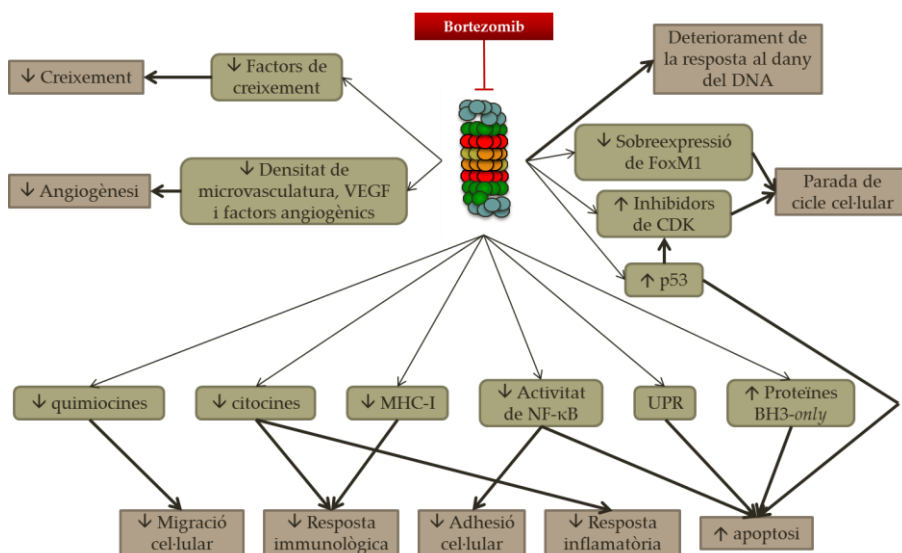
El bortezomib és un tipus de teràpia dirigida que forma part dels anomenats inhibidors del proteasoma. Està dissenyat específicament per tal d'inhibir l'activitat quimotripsina del proteasoma 26S. El bortezomib inhibeix el sistema ubiquitina-proteasoma o UPS (*Ubiquitin-Proteasome System*) de manera que altera diverses cascades de senyalització, com ara les relacionades amb el creixement cel·lular, la diferenciació i la supervivència.(99)

Des de desembre de 2008 està aprovat per la FDA (*Food and Drug Administration*) pel tractament del mieloma múltiple i pels casos de MCL que han rebut prèviament com a mínim un altre tractament.(100, 101)

Per tal de valorar l'aprovació del bortezomib en el MCL va ser portat a terme un estudi multicèntric de fase II, prospectiu, de braç simple, amb 155 pacients de MCL en què la patologia havia progressat després del tractament previ. Es van avaluar el temps de resposta i la duració d'aquesta fent servir els resultats obtinguts per tomografia computeritzada. En el 91 % dels pacients el tractament anterior incloïa antraciclina o mitoxantrona, ciclofosfamida i rituximab. El 37 % eren pacients refractaris fins a l'últim tractament administrat. Els pacients van rebre bortezomib 1,3 mg/m<sup>2</sup> per via intravenosa, en els dies 1, 4, 8 i 11 de cada 3 setmanes de cicle. La tasa de

resposta global va ser del 31 % (tenint en compte tant les respostes completes com les parcials) i la mediana de durada de resposta va ser de 9,3 mesos. Un 8 % dels pacients va presentar resposta completa, arribant a una durada mediana de resposta al tractament de 15,4 mesos. De mediana, el nombre de cicles en pacients que responien va ser de 8 i el temps medià de resposta va ser de 40 dies. Els efectes adversos comunicats amb més freqüència van ser fatiga (72 %), neuropaties perifèriques (55 %), restrenyiment (50 %), diarrea (47 %) i nàusea (44 %).(101, 102)

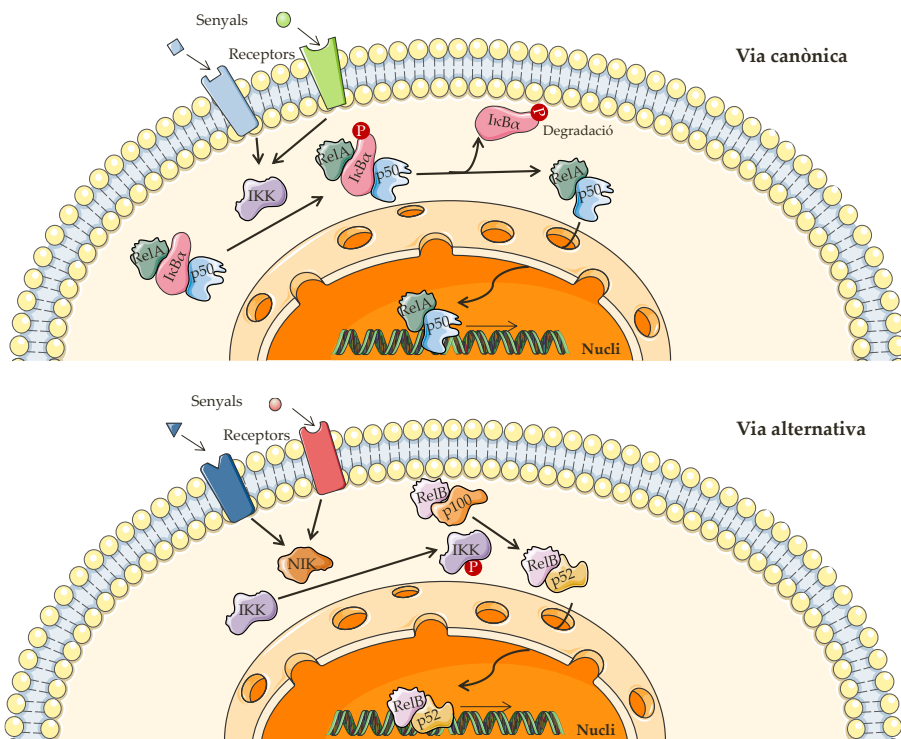
Són diversos els treballs que exploren l'activitat del bortezomib en el MCL, intentant elucubrar com el bloqueig de la degradació proteasomal resulta en la mort de les cèl·lules tumorals i intentant descobrir el perquè de les resistències al fàrmac. La inhibició del proteasoma té repercussió sobre moltes de les vies alterades en les cèl·lules tumorals. Hi ha evidències de la seva actuació sobre el cicle cel·lular, la via de NF- $\kappa$ B, la inducció d'apoptosi, l'estrès del reticle endoplasmàtic, la inhibició de l'angiogènesi, la reparació del DNA o la inhibició de la sobreexpressió del factor de transcripció FoxM1 (*Forkhead Box M1*), que indueix l'expressió de gens relacionats amb la progressió del cicle cel·lular i que es troba sobreexpressat en molts càncers però poc expressat en cèl·lules que no es divideixen (Figura 8).(103)



**Figura 8. Vies implicades en la inhibició del proteasoma en cèl·lules canceroses.** La inhibició del proteasoma afecta diferents vies relacionades amb el creixement de les cèl·lules tumorals, la seva supervivència i la resistència a fàrmacs.(108)

Un dels efectes del bortezomib és la inhibició de l'activació del factor de transcripció NF- $\kappa$ B. En condicions normals la via està finament controlada i juga un paper important en el desenvolupament dels limfòcits, però la desregulació de la via pot promoure el desenvolupament tumoral. L'activació de la via ve donada principalment per dues vies diferents: la canònica, amb p50/RelA i l'alternativa, amb p52/RelB. En condicions normals, els dímers de p50/RelA es troben en el citosol segrestat per la proteïna inhibidora I $\kappa$ B $\alpha$  (*Inhibitor of  $\kappa$ B alpha*). Quan s'activa la via, el complex IKK (*I $\kappa$ B Kinase*) s'activa i es fosforila I $\kappa$ B de manera que s'ubiquïtinitza i es degrada. D'aquesta forma s'allibera p50/RelA i es transloca al nucli, on regula la transcripció de membres antiapoptòtics (Bcl-2, Mcl-1, Bcl-X<sub>L</sub>, cIAPs (*cellular Inhibitors of Apoptosis Proteins*), cFLIP (*cellular FLICE-Inhibitory Protein*)) i a on promou la proliferació induint citocines com IL-2, IL-6 i CD40L. L'activació de la via alternativa es fa mitjançant citocines

que promouen l'activació de NIK (*NF-κB Inducing Kinase*) que fosforila IKK. IKK processa p100 a p52, resultant en la forma activa (Figura 9). Tot i així, hi ha altres formes minoritàries d'activar la via. Una d'elles és mitjançant la via PIR (*Proteasome Inhibitor Resistant*), en què la degradació de IκBα es fa de forma independent al proteasoma però dependent del calci, la calmodulina i dels canals de calci tipus L.



**Figura 9. Via de NF-κB.** L'activació de la via canònica s'inicia amb la fosforilació de l'inhibidor de p50/RelA, proteïnes que llavors s'alliberen i entren al nucli per iniciar la transcripció de gens antiapoptòtics i citocines. En la via alternativa, NIK fosforila IKK, i llavors p100 es processa a p52, que viatja al nucli amb RelB per iniciar la transcripció dels gens diana.(104)

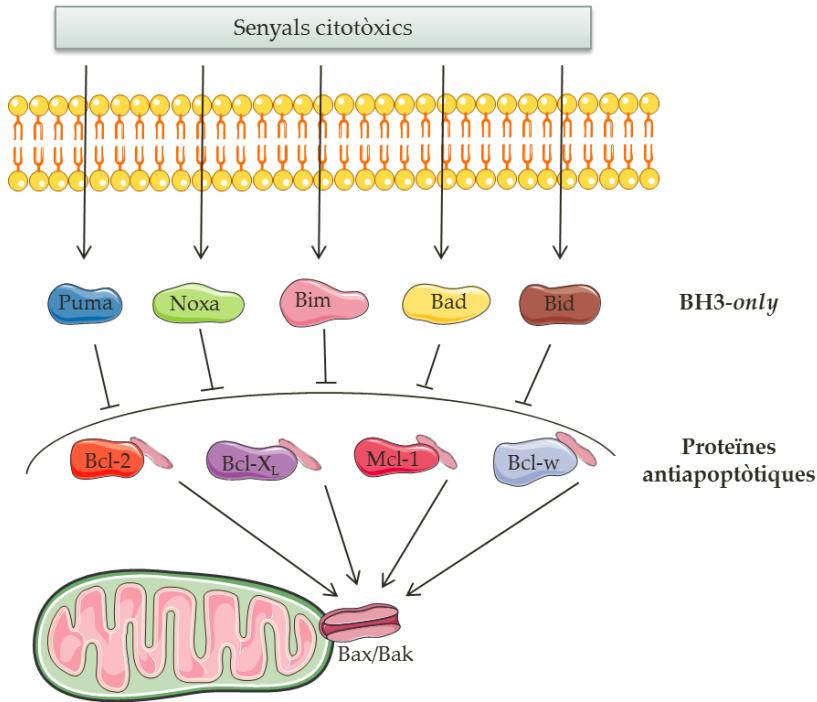


### Resistència a bortezomib

S'han descrit diferents motius per explicar l'existència de resistències a bortezomib.

En el cas de la via de NF- $\kappa$ B, el bortezomib és capaç d'actuar tant sobre la via canònica com a l'alternativa, però s'han trobat resistències que involucren la via PIR, activada constitutivament en diverses línies cel·lulars tumorals. Per tant, una possible explicació a la resistència a bortezomib seria el manteniment de la via NF- $\kappa$ B activa tot i l'ús del fàrmac atès que la via PIR és independent de la inhibició del proteasoma.(104, 105)

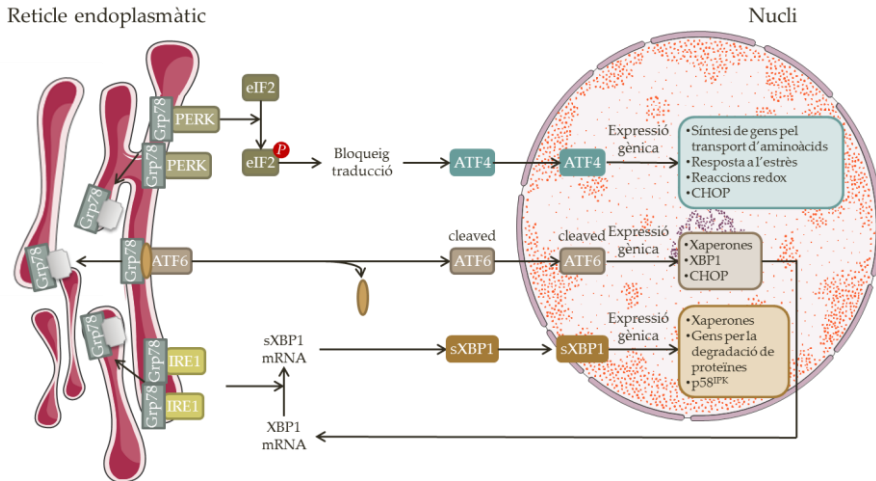
Una altra de les hipòtesis per explicar la resistència al bortezomib es basa en la sobreexpressió i l'acumulació de proteïnes antiapoptòtiques de la família de Bcl-2. La família de Bcl-2 està formada per reguladors de l'apoptosi, tant de proteïnes prosupervivència (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Mcl-1, Bcl-w i A1) com proapoptòtiques, on s'inclouen proteïnes multidomini (Bax, Bak i Bok) i les proteïnes BH3-*only* (Bim, Puma, Noxa, Bad, Bid, Bmf, Bik i Hrk). Quan les proteïnes BH3-*only* detecten senyals citotòxics, interaccionen amb els membres antiapoptòtics per tal de permetre l'oligomerització de Bax i Bak, la permeabilització del mitocondri i l'alliberament de factor proapoptòtic, l'activació de caspases i finalment, la mort cel·lular (Figura 10). La via de Bcl-2 es troba desregulada en moltes neoplàsies, per exemple, en el MCL s'han descrit nivells elevats de les proteïnes Bcl-2 i Bcl-X<sub>L</sub>, quelcom relacionat amb l'activació de la via NF- $\kappa$ B. També s'ha descrit que el bortezomib indueix l'acumulació de la proteïna antiapoptòtica Mcl-1 i l'activació de la proteïna proapoptòtica Noxa, que només contraresta en part l'acció de Mcl-1, el que fa que l'acumulació d'aquesta proteïna pugui retardar l'apoptosi induïda pel bortezomib. En el MCL, s'ha demostrat que el bloqueig de l'expressió de Noxa redueix l'activitat del bortezomib en un 35 %.(106-108)



**Figura 10. Família proteica Bcl-2.** Les proteïnes BH3-only s'engrenen amb les proteïnes antiapoptòtiques per tal d'aturar el seu bloqueig sobre Bax i Bak i així fer que oligomeritzin i provoquin la permeabilització de la membrana mitocondrial.(106)

També s'ha estudiat la relació entre la pèrdua de sensibilitat al bortezomib i la regulació positiva de la xaperona BiP (*Binding immunoglobulin Protein*)/Grp78 (78 kDa *Glucose-regulated protein*). Aquesta xaperona controla la via de l'estrès del reticle endoplasmàtic. De fet, BiP/Grp78 forma complex amb altres xaperones del reticle endoplasmàtic, incloent-hi Hsp90 (*Heat Shock Protein of 90 kDa*). Quan té lloc l'acumulació de proteïnes poliubiquitinades i amb un plegament incorrecte en el lumen del reticle, BiP/Grp78 es dissocia dels dominis luminals de les proteïnes que actuen com a sensor, iniciant la resposta a proteïnes desplegadas o UPR (*Unfolded Protein Response*). Es llavors quan es desencadena un programa transcripcional en el nucli i amb la fosforilació d'eIF2 (*Eukaryotic Initiation Factor 2*) s'alenteix el procés de síntesi proteica (Figura 11). Aquesta resposta promou la supervivència cel·lular,

però en darrer lloc també activa l'apoptosi en cas que els mecanismes per protegir la integritat cel·lular no funcionin. Segons les dades publicades l'acumulació de BiP/Grp78 podria estar relacionada amb la resistència als inhibidors del proteasoma. L'estabilització de BiP/Grp78 és causada per un augment de l'activitat xaperona de Hsp90 en les cèl·lules de MCL resistent a bortezomib. En conseqüència, el tractament d'aquestes cèl·lules amb IPI-504 (un inhibidor d'Hsp90) conjuntament amb el tractament amb bortezomib comporta una inducció sinèrgica de mort cel·lular atès que la combinació provoca la dissociació dels complexos entre Hsp90 i BiP/Grp78, evita l'acumulació de BiP/Grp78 i indueix la inhibició d'UPR i també l'estimulació de la despolarització mitocondrial intervinguda per Noxa. També *in vivo* es veu aquest efecte promotor de l'apoptosi en combinar tots dos fàrmacs a través de la inhibició de l'acumulació de BiP/Grp78.(109, 110)

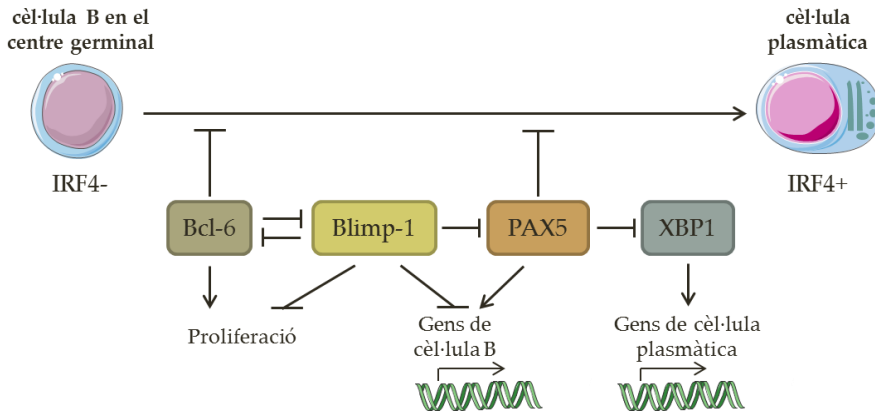


**Figura 11. Resposta a proteïnes desplegadas.** Quan s'hi troben proteïnes desplegadas, BiP/Grp78 es dissocia dels tres receptors d'estrès del reticle endoplasmàtic, PERK (*Pancreatic ER kinase (PKR)-like ER Kinase*), ATF6 (*Activating Transcription Factor 6*) i IRE1 (*Inositol-Requiring Enzyme 1*), permetent la seva activació que té lloc de forma seqüencial començant per PERK, seguida ràpidament per ATF6 i per últim per IRE1. L'activació de PERK bloqueja la síntesi proteica en fosforilar el factor d'iniciació eucariota eIF2 $\alpha$ . Aquesta fosforilació permet la traducció d'ATF4, que té lloc a través d'una via independent a eIF2 $\alpha$ . ATF4, que és un factor de transcripció, es transloca al nucli on indueix la transcripció de gens necessaris per recuperar l'homeòstasi del reticle endoplasmàtic. ATF6 s'activa per proteolisi després de la seva translocació des del reticle endoplasmàtic cap a l'aparell de Golgi. ATF6 actiu també és un factor de transcripció que regula l'expressió de xaperones del reticle endoplasmàtic i de XBP1 (*X-box Binding Protein 1*), un altre factor de transcripció. Per arribar a la forma activa de XBP1, aquest ha de patir *splicing* del mRNA, quelcom portat a terme per IRE1. XBP1 un cop ha sofert l'*splicing* (sXBP1) en transloca al nucli i controla la transcripció de xaperones, de la coxaperona i inhibidor de PERK p58<sup>IPK</sup>, i també de gens relacionats amb la degradació proteica.(110)

La resposta a bortezomib està estretament lligada a l'estrès oxidatiu, precisament perquè la inhibició proteasomal porta com a resposta aquest tipus d'estrès provocat per l'acumulació de proteïnes amb un plegament incorrecte. Tot plegat, genera grans quantitats d'espècies reactives d'oxigen o ROS (*Reactive Oxygen Species*), contribuint a l'activitat citotòxica del bortezomib. Un regulador clau de la resposta de l'estrès oxidatiu és el factor

de transcripció NRF2 (*NFE2-Related Factor 2*), que en condicions de no estrès cel·lular, es troba segrestat per la proteïna KEAP1 (*Kelch-like ECH-Associated Protein 1*) en el citosol. Quan KEAP1 és oxidada per les ROS, s'allibera NRF2, que pot viatjar al nucli. En resposta a la inhibició del proteasoma, els tumors de MCL sensibles a bortezomib mostren un fort augment en l'expressió del gens diana de NRF2, així com de gens relacionats amb la ubiquitinització proteica o amb els components del proteasoma, mentre que els tumors resistents mostren mínims canvis en l'expressió gènica. També s'ha descrit però, que una incrementada expressió dels gens diana de NRF2 en mostres basals es correlaciona amb una pobra sensibilitat a la inhibició del proteasoma.(111)

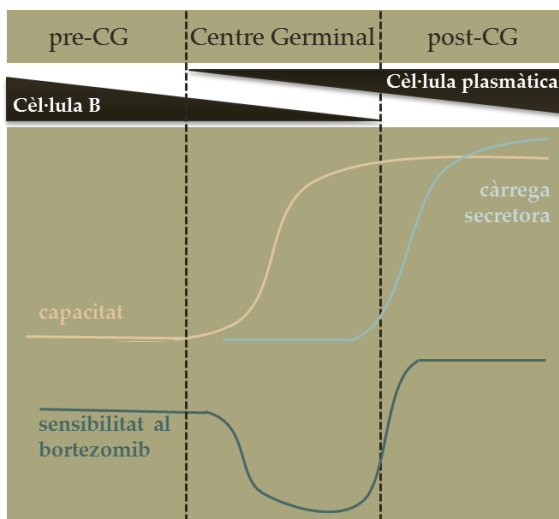
Un altre estudi recent relaciona la resistència a bortezomib amb el programa de diferenciació plasmocítica. Les cèl·lules plasmàtiques, els efectors finals de la immunitat humoral, són cèl·lules que no es divideixen i que es dediquen plenament a la síntesi i secreció d'immunoglobulines. Les cèl·lules resistents a bortezomib presenten només algunes de les característiques de les cèl·lules plasmàtiques, com ara l'expressió del factor de transcripció IRF4 i dels marcadors de superfície CD38 i CD138, però no arriben a presentar *splicing* (empalmament) de XBP1 (*X-box Binding Protein 1*) ni una augmentada producció d'immunoglobulines (Figura 12).(112, 113)



**Figura 12. Expressió gènica durant la diferenciació plasmocítica.** El factor de transcripció IRF4 no és expressat en la majoria de cèl·lules B en el centre germinal, com tampoc no ho és Blimp-1. Els factors de transcripció Bcl-6, Blimp-1, PAX5 (*Paired box 5*) i XBP1 formen un circuit de regulació que controla la progressió de les cèl·lules B en el centre germinal cap a la seva diferenciació en cèl·lules plasmàtiques secretores d'immunoglobulines. El repressor Bcl-6 bloqueja l'expressió de Blimp-1, que és un regulador mestre de l'inhibidor del cycle cel·lular p27<sup>KIP1</sup>. Quan s'expressa Blimp-1 s'inhibeix de manera recíproca l'expressió de Bcl-6, s'extingeix el programa d'expressió de gens de cèl·lula B i s'inhibeix l'expressió de gens inductors de la proliferació. Blimp-1 també inhibeix PAX5, que indueix l'expressió de gens de cèl·lula B així com la repressió de XBP1. XBP1 és un factor que actua de forma positiva en la diferenciació plasmàtica. Probablement aquest augmenta l'expressió de gens essencials per les funcions de la cèl·lula plasmàtica, com la secreció d'immunoglobulines. Un cop la cèl·lula esdevé cèl·lula plasmàtica expressa gens com IRF4 i Blimp-1.(69)

Es postula que en la resistència al bortezomib l'equilibri entre la càrrega proteica i la capacitat del proteosoma és clau: quan s'indueix la diferenciació plasmocítica a través de l'estimulació del TLR9, la sensibilitat al bortezomib canvia al llarg del procés des de cèl·lula B fins a cèl·lula plasmàtica. Durant el procés de diferenciació plasmocítica les cèl·lules adquireixen un fenotip que els hi confereix una millora en la capacitat de lidiar amb el futur augment de càrrega proteica. Mentre encara no es secreten proteïnes, això els hi atorga avantatge davant l'activitat antitumoral del bortezomib en la inhibició del proteosoma. Quan la cèl·lula ja ha completat el procés de diferenciació

plasmocítica i la secreció proteica està a punt, les cèl·lules es tornen a sensibilitzar al bortezomib (Figura 13).(112, 113)



**Figura 13. Model de resistència a bortezomib en el MCL.** La sensibilitat a bortezomib es mostra com una funció de la càrrega secretora relativa a la capacitat de la cèl·lula de lidiar amb la càrrega proteica. Les cèl·lules que són resistents a bortezomib es diferencien cap a adquirir un fenotip de cèl·lula plasmocítica que augmenta la seva capacitat per suportar la càrrega proteica. En absència d'una incrementada síntesi proteica, això els hi confereix un avantatge en supervivència durant la inhibició del proteasoma. En cèl·lules completament diferenciades en cèl·lules plasmàtiques, la càrrega secretora augmenta i les cèl·lules es tornen a sensibilitzar al bortezomib.(112)

Recentment també s'ha demostrat que el *peryllil alcohol* (POH), un monoterpè que inhibeix els canals de calci tipus L, inhibeix el creixement tumoral i incrementa els efectes proapoptòtics en combinació amb altres fàrmacs com bortezomib o el cisplatí en diversos tumors hematològics. La TG2 (*Transglutaminase 2*) és un enzim dependent de calci que forma unions entre lisines i glutamines creant un enllaç intra o intermolecular molt resistent a la degradació proteolítica. La TG2 té funcions fisiològiques associades a la supervivència i les cèl·lules resistents a la quimioteràpia poden presentar nivells elevats d'aquesta proteïna. A més a més, la sobreexpressió de TG2

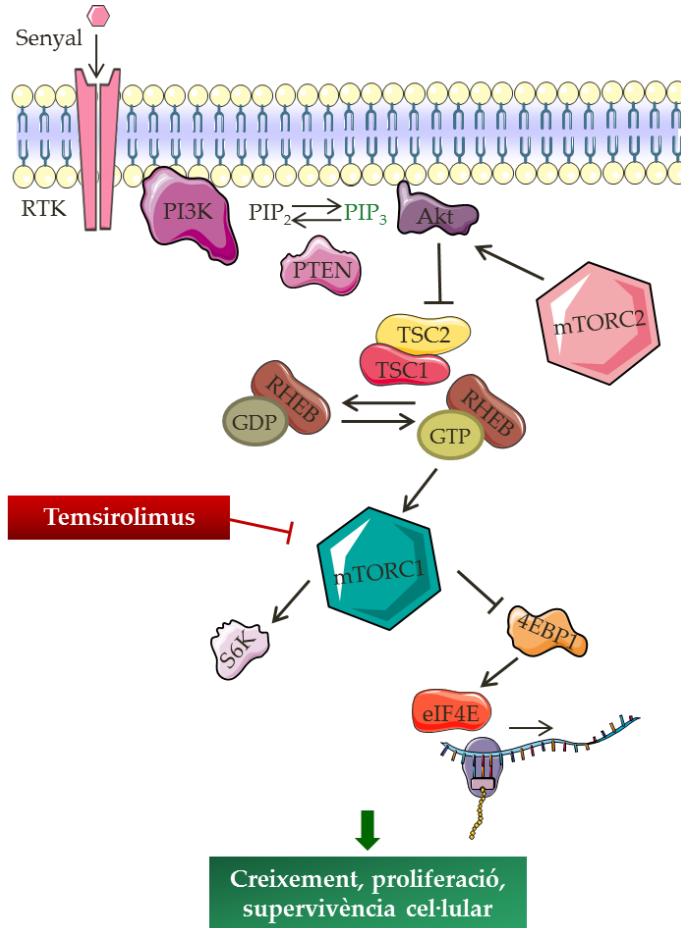
està lligada a l'expressió constitutiva de la via NF- $\kappa$ B. En un estudi publicat amb línies de MCL es demostra com les línies resistents a bortezomib presenten alts nivells de TG2 i que la inhibició d'aquesta sensibilitza les cèl·lules al bortezomib, que indueix apoptosi en els cèl·lules inhibint NF- $\kappa$ B. També la combinació del POH amb el bortezomib en el MCL inhibeix l'expressió de NF- $\kappa$ B i incrementa la citotoxicitat del bortezomib, causada en part, perquè la TG2 és un enzim dependent de calci i que el POH bloqueja els canals de calci tipus L.(114-116)

### **Temsirolimus**

La via de PI3K/Akt/mTOR s'inicia amb l'activació de PI3K, generalment a través d'un receptor cinasa o RTK (*Receptor Tyrosine Kinase*), que provoca la conversió del PIP<sub>2</sub> (*Phosphatidylinositol diphosphate*) cap a PIP<sub>3</sub> (*Phosphatidylinositol triphosphate*). PTEN (*Phosphatase and Tensin homolog*) és una fosfatasa que actua fent la reacció en sentit contrari. La unió d'Akt a PIP<sub>3</sub> facilita la seva fosforilació. A més, també en té lloc una segona fosforilació en Akt que és induïda per mTORC2 (*mTOR Complex 2*). mTOR, que es regula a través d'Akt, forma dos complexos: mTORC1 (*mTOR Complex 1*), on es troba amb Raptor i mLST8 i mTORC2, on Raptor és substituït per Rictor. mTORC1 s'activa amb la inhibició del complex TSC1-TSC2 (*Tuberous Sclerosis proteins 1 and 2*) per part d'Akt. En inhibir-se TSC1-TSC2, la seva activitat GAP (*GTPase Activating Protein*) també s'inhibeix i s'acumula la proteïna RHEB (*Ras Homolog Enriched in Brain*) en la seva forma activa (amb GTP (*Guanosine Triphosphate*)), el que fa activar mTOR. Llavors el complex mTORC1 fosforilant S6K (*S6 Kinase*), promovent la biogènesi ribosomal, com EIF4EBP1 (*Eukaryotic translation Initiation Factor 4E Binding Protein 1*), que inhibeix la seva activitat repressora i llavors es facilita la separació, fosforilació i activació de eIF4E (*Eukaryotic Initiation Factor 4E*). eIF4E forma complex amb



eIF4A i eIF4G i així es permet la traducció de proteïnes com Mcl-1, MYC, ciclina D1 i Bcl-X<sub>L</sub>. A més, Akt també està implicat en la regulació de nombroses proteïnes com ara les reguladores de l'apoptosi de la família de Bcl-2 (per exemple inhibeix les proteïnes proapoptòtiques com Bad, Bim i Puma i les antiapoptòtiques com Bcl-2, Mcl-1 i Bcl-X<sub>L</sub>) (Figura 14).(117, 118)



**Figura 14. Via de PI3K/Akt/mTOR.** Quan la via és activada, es produeix PIP<sub>3</sub>, que serveix d'ancoratge i activació d'Akt. Akt inhibeix TSC1-TSC2, activant així mTORC1 i alhora estimulament la cascada de senyalització fins a activar la traducció proteica.(117)

Temeirolimus és un anàleg de la rapamicina i un inhibidor selectiu de mTOR. Com la rapamicina, el temeirolimus és un inhibidor al·lostèric que no s'uneix

directament en el domini cinasa, sinó que s'uneix a un complex proteic intracel·lular (com FKBP-12) que després s'uneix i inhibeix l'activitat serina/treonina proteïna cinasa del complex mTORC1. Aquesta inhibició de mTOR bloqueja la fosforilació d'EIF4EBP1 i de S6K i per tant, altera la traducció de diverses proteïnes, com algunes de les involucrades en la regulació del cicle cel·lular com serien les ciclines D o MYC. En els models preclínic, s'ha vist com el tractament amb el fàrmac porta a parada de cicle en G<sub>1</sub>.(119)

Actualment, l'ús del temsirolimus està acceptat per casos de MCL en recaiguda o resistent al tractament. Atès que el MCL està considerat com una "malaltia minoritària", el temsirolimus va ser designat un "fàrmac orfe" per aquesta malaltia per l'EMA (*European Medicines Agency*) el novembre del 2006.(120, 121)

L'assaig clínic que va portar a l'aprovació del temsirolimus en el MCL va ser un assaig controlat, aleatoritzat i multicèntric en què es comparaven dues dosis de temsirolimus amb el tractament d'elecció de l'investigador en pacients en recaiguda o resistents al tractament. Els pacients havien rebut prèviament de 2 a 7 tractaments (incloent-hi antraciclins, agents alquilants i rituximab). El temsirolimus es va administrar per via intravenosa (175 mg en 3 dosis setmanals successives seguides de 75 mg setmanals, o bé 175 mg en 3 dosis setmanals successives seguides de 25 mg setmanals). La primera dosi de temsirolimus a la que s'ha fet referència va portar una millora significativa de la supervivència lliure de progressió (4,8 mesos) en comparació amb el grup amb el tractament d'elecció de l'investigador (1,9 mesos). En el cas de grup de temsirolimus administrat 175/25 mg no va presentar una millora significativa (3,4 mesos en comparació amb l'1,9 mesos del grup amb el tractament escollit per l'investigador). Els efectes adversos més freqüentment

reportats van ser trombocitopènia (72 %), fatiga (63 %), anèmia (52 %), diarrea (44 %), febre (39 %) i anorèxia (37 %).(121, 122)

### **Lenalidomida**

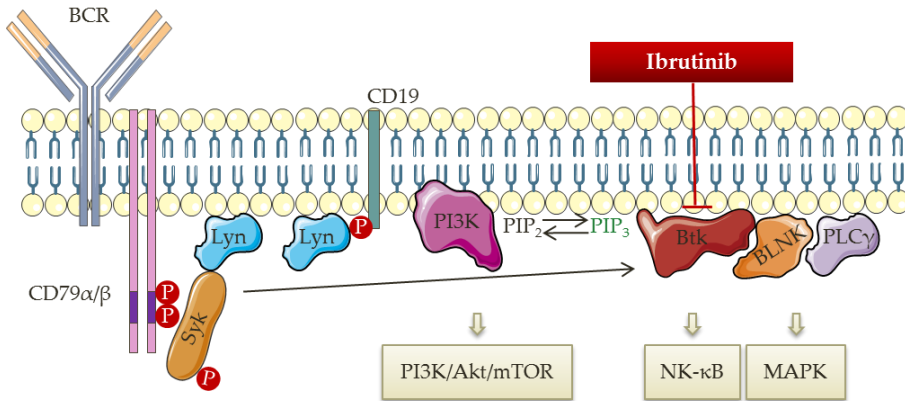
La lenalidomida és un dels fàrmacs immunomoduladors o IMiD (*Immunomodulatory Drugs*) que ha mostrat una millor eficàcia antitumoral en un ampli nombre de neoplàsies, especialment en les neoplàsies hematològiques de limfòcits B. En l'any 2005 va ser aprovat el seu ús per la FDA pel tractament de la síndrome mielodisplàsica o MDS (*Myelodysplastic Syndrome*) amb deleció de 5q, amb o sense altres anormalitats citogenètiques. En 2006 també va ser aprovada en mieloma múltiple per tractar casos refractaris o en recaiguda. Per la seva eficàcia en el MM, la lenalidomida ha estat provada en altres tumors de cèl·lules B, inclòs el MCL. El juny del 2013 la FDA va aprovar la seva indicació pel tractament de pacients de MCL amb recaigudes o progressió després de dos tractaments previs, un dels quals ha de ser bortezomib.(123, 124)

L'aprovació en el cas del MCL va estar basada en els resultats d'un assaig clínic multicèntric, d'un braç, on van ser acceptats 134 pacients de MCL que presentaven recaigudes després del tractament amb bortezomib o bé eren refractaris al tractament amb aquest fàrmac. Dels 133 pacients que van ser avaluables per eficàcia, la taxa de resposta global va ser del 26 %, la resposta completa va ser aconseguida pel 7 % dels pacients i la resposta parcial pel 19 % dels tractats amb la lenalidomida. La mediana de la durada de la resposta pels 34 pacients que van aconseguir resposta completa o parcial va ser de 16,6 mesos. Les dades de seguretat van ser avaluades, tenint com a resultat que un 57 % dels pacients van haver d'interrompre almenys en una dosi el tractament i un 38 % van haver de reduir la dosi almenys una vegada a causa dels efectes adversos. Un 19 % dels pacients van haver de deixar de rebre el

tractament. Els efectes adversos més freqüents ( $\geq 15\%$ ) de grau 1-4 van ser neutropènia, trombocitopènia, fatiga, anèmia, diarrea, nàusea, tos, febre, exantema, dispnea, pruíja, restrenyiment, edema perifèric i leucopènia. Els efectes adversos més freqüents ( $\geq 5\%$ ) de grau 3-4 van ser neutropènia, trombocitopènia, anèmia, pneumònia, leucopènia, fatiga, neutropènia febril, dispnea i diarrea.(124, 125)

### **Ibrutinib**

Els limfòcits B madurs essencialment són cèl·lules que s'encarreguen de produir anticossos. Per tal de reconèixer l'antigen fan servir un receptor específic del tipus cel·lular, el BCR. Aquest receptor consta d'una subunitat d'unió a l'antigen: la immunoglobulina (IgD o IgM), que està formada per dues cadenes pesades i dues lleugeres i també per  $CD79\alpha/\beta$ , una subunitat que participa en la transducció del senyal. Quan el BCR s'estimula,  $CD79\alpha/\beta$  és fosforilat en els dominis ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*) per membres de la família Src cinasa (c-Src, Yes, Fyn, Lyn, Lck, Hck, Fgr, Blk i Yrk). En els limfòcits B, la cinasa predominant és Lyn. Les tirosines que s'han fosforilat en els ITAM fan d'ancoratge per Syk (*Spleen tyrosine kinase*), que en unir-se canvia la seva conformació tot exposant els residus que han d'ésser fosforilats per Lyn, donant lloc a l'activació de Syk. Alhora, CD19 també intervé en la via de senyalització sent fosforilat per Lyn i activant el PI3K en la membrana, reclutant llavors Btk (*Bruton's tyrosine kinase*) mitjançant  $PIP_3$ . Tant Syk com Lyn amplifiquen el senyal a través de Btk, que s'uneix a proteïnes adaptadores com BLNK (*B-cell Linker*) per acabar activant  $PLC\gamma$  (*Phospholipase C-gamma*),  $NF-\kappa B$  i MAPK (Figura 15).(126)



**Figura 15. Via del BCR.** En ser estimulat el BCR, Lyn fosforila els dominis ITAM de CD79α/β. Llavors, Syk s'ancora i es fosforila per Lyn. CD19α/β també es fosforila per Lyn i recluta PI3K a la membrana. L'activitat de PI3K i Syk transdueixen el senyal a Btk, que s'acobla a altres proteïnes, donant lloc a l'activació de les vies com MAPK i NF-κB.(126)

N'és conegut que l'activació constitutiva del BCR està present en diverses neoplàsies de limfòcits B, com és el cas del MCL, fet que juga un paper important en la supervivència de les cèl·lules. Probablement, sigui Syk qui tingui un rol fonamental en aquesta activació.(86)

L'ibrutinib és un inhibidor oral covalent de Btk que redueix de manera significativa el creixement tumoral. En estudis clínics, l'ibrutinib ha mostrat activitat antitumoral en neoplàsies de tipus B. Basat en estudis de fase Ib/II, va ser aprovat per la FDA el novembre del 2013 pel tractament de casos de MCL en pacients prèviament tractats.(127-130)

L'aprovació es va basar en els resultats d'un estudi multicèntric, internacional, amb un braç únic, en què es van acceptar 111 pacients de MCL prèviament tractats. Els resultats d'eficàcia van demostrar una tasa de resposta global del 66 %. Disset dels pacients van presentar resposta completa i el 49 % dels pacients van aconseguir resposta parcial. La mediana de la durada de la resposta va ser de 17,5 mesos. En el mateix estudi va ser

avaluada la seguretat, sent les reaccions adverses més comunes ( $\geq 20\%$ ) les següents: trombocitopènia, diarrea, neutropènia, anèmia, fatiga, dolor múscul-esquelètic, edema perifèric, infecció de les vies respiratòries altes, nàusea, aparició de blaus, dispnea, restrenyiment, erupció, dolor abdominal, vòmits i disminució de la gana. Un  $5\%$  dels pacients van tenir episodis hemorràgics de grau 3 o superior. Els episodis hemorràgics (incloent-hi hematomes de qualsevol grau) van ocórrer en un  $48\%$  dels pacients. El  $25\%$  van patir infeccions de grau 3 o superior.(129, 130)

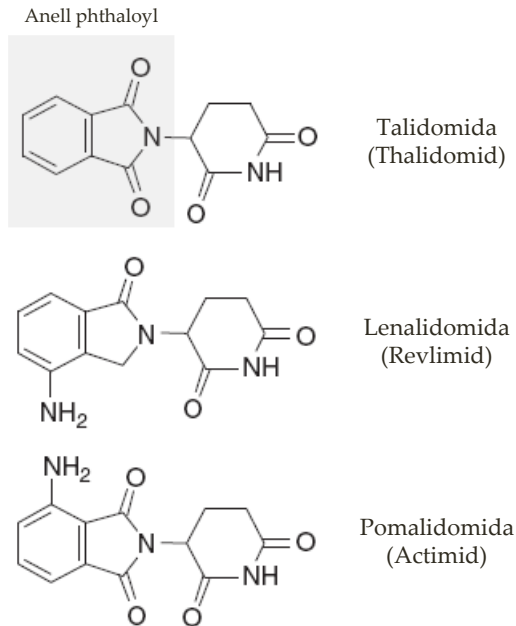
## **2. Fàrmacs immunomoduladors com estratègia terapèutica en les neoplàsies limfoides de cèl·lula B**

---

El terme “fàrmacs immunomoduladors” (IMiDs) fa referència a fàrmacs anàlegs estructurals i funcionals de la talidomida que estan sota llicència de Celgene Corporation (Summit, NJ, EEUU) pel tractament de diverses malalties inflamatòries i neoplàsiques. Es tracta de molècules petites i biodisponibles per via oral.(131)

La talidomida i els seus derivats IMiD han estat utilitzats durant la darrera dècada per tractar les malalties hematològiques malignes. Tot i el seu ús, el seu mecanisme d'acció encara no és ben conegut. Les principals entitats d'aquest grup són la mateixa talidomida i la lenalidomida, que tenen propietats immunomodulatòries i antiangiogèniques, així com efectes directes sobre els tumors.(132, 133)

Els IMiD van ser inicialment definits per la seva capacitat inhibidora de la secreció de  $TNF\alpha$  induïda per lipopolisacàrid i van ser subclassificats dependent de la seva activitat sobre altres citocines. Així, els IMiD de classe I inclouen els inhibidors de citocines inflamatòries induïdes per LPS (com  $TNF\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 i IL-12), mentre que els de classe II mostraven selectivitat per la supressió de  $TNF\alpha$ . Entre els components de la classe I en trobem la talidomida i els seus anàlegs amino-substituïts. Els components de la classe II són compostos estructuralment diversos unificats per la seva capacitat per antagonitzar la fosfodiesterasa-4. Són els anàlegs pertanyents a la classe I els que han guanyat més rellevància antitumoral en els darrers anys (Figura 16).(131)



**Figura 16. Estructura química dels IMiD.** Estructura química de la talidomida i dels seus anàlegs amino-phthaloyl-substituïts.(131)

## i. Entitats químiques

### a. Talidomida

La talidomida és un derivat de l'àcid glutàmic sintetitzat a Alemanya l'any 1954. Es tracta d'una molècula quiral, en què tots dos enantiòmers porten a terme diferents activitats. Tot i així, no és possible seleccionar les accions d'un sol dels enantiòmers perquè poc temps després de l'administració té lloc una interconversió fisiològica entre totes dues formes  $S(-)$  i  $R(+)$ . A finals de la dècada dels cinquanta es va fer servir en dones embarassades per tal de prevenir els vòmits i induir un efecte sedant durant el primer trimestre de gestació. Aquest ús va tenir com a conseqüència un dels majors desastres farmacològics de la història atès que l'administració durant la gestació es va associar a teratogènia (amèlia i focomèlia). Tot i això, el fàrmac va ser utilitzat de nou per les seves propietats antiinflamatòries en lesions per l'eritema



nodós leprós, sent aprovat el seu ús per la FDA el 1998. La troballa de l'activitat antiangiogènica de la talidomida va fer que es comencés a estudiar la droga com un agent antineoplàstic. En el 1998, aquesta es va començar a estudiar en pacients de mieloma múltiple amb malaltia refractària i amb recaigudes, atès que es tracta d'una malaltia on l'angiogènesi té un paper destacat. No només s'ha descobert que la lenalidomida presenta propietats antiangiogèniques i immunomoduladores, a més a més, la talidomida també regula l'expressió de molècules d'adhesió, inhibeix la producció de TNF $\alpha$ , estimula la proliferació de cèl·lules T citotòxiques i afavoreix el bloqueig del cicle cel·lular en fase G<sub>1</sub>.(132, 134)

#### **b. Lenalidomida**

Per tal d'aprofitar els efectes beneficiosos antitumorals de la talidomida però evitar els efectes adversos inherents a la seva administració, s'han desenvolupat altres fàrmacs amb un mecanisme d'acció anàleg. La modificació que presenten els fàrmacs coneguts com a IMiD en comparació amb la talidomida és un grup amino afegit en el quart carboni de l'anell *phthaloyl*, donant lloc a anàlegs 4-amino. En el cas de la lenalidomida, a més, desapareix el grup carbonil de l'anell.(135)

#### **c. Pomalidomida**

L'addició d'un grup amino en la posició 4 de l'anell *phthaloyl* de la talidomida forma el compost CC-4047 o pomalidomida. Com els altres membres de la família, es tracta d'un fàrmac antiangiogènic i també immunomodulador. Té un bon perfil de toxicitat, amb la neutropènia com a efecte advers més freqüent. Està aprovada per la FDA pel tractament de pacients de mieloma múltiple que han rebut almenys dos tractaments previs, incloent-hi la lenalidomida i el bortezomib i que hagin presentat progressió de la malaltia

durant o dins els 60 dies des de la finalització de l'última teràpia.(131, 136-138)

## **ii. Mecanismes d'acció**

Els IMiD actuen a diferents nivells, directament sobre les cèl·lules malignes o indirectament actuant sobre el seu microambient i la immunitat tumoral. Són fàrmacs que han demostrat un efecte immunomodulador, afectant tant en l'àmbit cel·lular com en l'humoral del sistema immunitari. A més, són destacables les seves propietats antiangiogèniques (Figura 17).(139)

### **a. Activitat antiinflamatòria associada a la inhibició de TNF $\alpha$**

L'activitat antiinflamatòria dels IMiD s'ha emprat pel tractament de l'eritema nodós leprós, una complicació de la infecció per *Mycobacterium leprae*. Aquests pacients, que tenen augmentats els nivells sanguinis de TNF $\alpha$ , disminueixen els nivells després de l'administració de la talidomida. La supressió de TNF $\alpha$  té lloc per sota de la via del receptor activat, accelerant la degradació del mRNA de TNF $\alpha$ . A més, també té un paper en la regulació de la transcripció del mRNA amb regions 5' no traduïdes en disminuir els nivells d'eIF4E, que recluta el mRNA cap al ribosoma, sent limitant la seva disponibilitat pels mRNA amb el 5' no traduït. A través de la regulació d'eIF4E, els IMiD regulen l'expressió de gens proinflamatoris, incloent-hi COX-2 (*Cyclooxygenase-2*). Hi ha evidències clíniques que apunten que la inhibició selectiva de COX-2 en el MM té activitat antitumoral, per tant pot ser rellevant l'ús d'IMiD com antiinflamatoris en aquesta malaltia.(131, 140)

### **b. Coestimulació dels limfòcits T**

La coestimulació de les cèl·lules T per part dels IMiD augmenta la immunitat antitumoral. Els IMiD modulen l'expressió de citocines en funció del tipus cel·lular sobre el que actuen i en funció del context per tal d'estimular o

inhibir la secreció d'interleucines. Els IMiD estimulen la secreció de IL-2 i IFN $\gamma$  per part dels limfòcits T induïda per la unió de CD3, per l'estimulació mitogènica o en resposta a la presentació d'antígens per cèl·lules dendrítiques. La lenalidomida també induïx la fosforilació de CD28, estimulant cascades de senyalització com la de PI3K i la de NF- $\kappa$ B.(131, 141, 142)

**c. Augment de les funcions efectores dels limfòcits T citotòxics i de les cèl·lules NK**

L'augment de les cèl·lules efectores citotòxiques és una conseqüència directa de l'activitat immunoestimuladora dels IMiD en les cèl·lules T. La secreció d'IL-2 i d'IFN $\gamma$  per les cèl·lules T CD4 estimulada pel tractament amb els IMiD augmenta la mort produïda per les cèl·lules NK (*Natural Killer*) contra línies cel·lulars leucèmiques i també cèl·lules de MM autòlogues *in vitro*. La resposta a talidomida en pacients de MM es correlaciona amb un augment de cèl·lules NK en sang perifèrica.(131, 143)

**d. Propietats antiangiogèniques**

L'angiogènesi és un procés important pel creixement tumoral i la metastasi. La talidomida i els seus anàlegs han demostrat activitat *in vivo* contra factors proangiogènics com IL-6, TNF $\alpha$ , VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) i NF- $\kappa$ B i també en la síntesi de prostaglandines, que podria regular l'angiogènesi indirectament. Els IMiD disminueixen la producció paracrina de VEGF i d'IL-6 tant a l'estroma de la medul·la òssia com a cèl·lules de MM, tant soles com en cocultiu. En general, els IMiD modulen l'angiogènesi a diferents nivells, incloent-hi la regulació de la xarxa de citocines, les interaccions locals entre el tumor i l'estroma, l'expressió en superfície de receptors de VEGF i la senyalització intracel·lular de vies relacionades.(131)

### e. Teratogenicitat

Des de la perspectiva translacional, el fet desitjable és poder retirar la capacitat teratogènica de la talidomida i dels IMiD. L'activitat teratogènica ve donada per diferents mecanismes: 1. Angiogènesi: la creació d'una extremitat nova requereix també la creació d'una xarxa vascular que és molt sensible a l'activitat antiangiogènica de la talidomida; 2. Estrès oxidatiu: la talidomida indueix la depleció de glutatió i l'oxidació del DNA, que porten a generar espècies reactives d'oxigen. La inducció d'estrès oxidatiu durant el desenvolupament de les extremitats indueix alteracions en les vies de supervivència com NF- $\kappa$ B, BMP (*Bone Morphogenetic Protein*)/Dickkopf-1/Wnt i PI3K/Akt, culminant en la disminució de FGF (*Fibroblast Growth Factors*) i la inducció d'apoptosi; i 3. Disfunció de cereblon: cereblon és una proteïna relacionada amb el retard mental que es necessita per tal que la ubiquitina ligasa E3 pugui dur a terme la seva activitat en el complex multiproteic que inclou la *DNA-binding protein 1* i la Cullin 4. La talidomida té propietats antiangiogèniques intervingudes per FGF a través de l'acció de cereblon.(131)

### f. Inhibició de la proliferació

La sobreexpressió del factor de transcripció IRF4 és comú en el mieloma múltiple i està associat a un pitjor pronòstic. En aquest model, s'ha descrit que l'activitat antitumoral de la lenalidomida està relacionada amb la disminució d'aquest factor de transcripció. A més, aquesta disminució alhora està associada amb una disminució dels nivells de MYC, així com a la parada de cicle en G<sub>1</sub>, i per tant a una disminució en la proliferació cel·lular. La disminució d'IRF4 resulta en un increment de p27<sup>KIP1</sup> i una reducció en la quantitat de retinoblastoma fosforilat, i està relacionada amb una inhibició de la progressió de la fase S del cicle cel·lular i de la replicació del DNA i en conseqüència, amb la parada de cicle cel·lular. El tractament amb

lenalidomida en pacients de MM amb una expressió elevada d'IRF4 comporta una supervivència global més llarga que altres tractaments.(144)

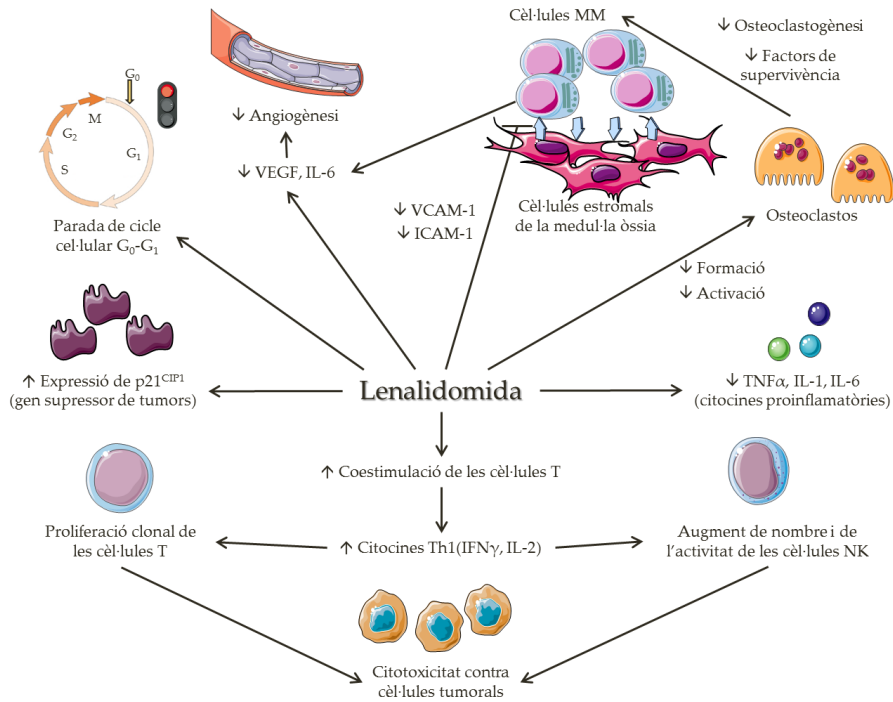
D'especial interès és la proteïna cereblon, que en els darrers anys ha guanyat importància en relació amb el mecanisme d'acció dels IMiD. Tot i que la depleció de cereblon en cèl·lules de MM és tòxica, les cèl·lules que sobreviuen esdevenen resistents tant a la lenalidomida com a la pomalidomida, però no a altres fàrmacs com el bortezomib o la dexametasona. S'ha publicat que línies cel·lulars de MM canvien el perfil d'expressió gènica esperat amb el tractament amb lenalidomida en presència de la depleció de *CRBN*, suggerint una presència necessària de cereblon per tal que la lenalidomida pugui exercir la seva activitat. Una de les dianes de cereblon és IRF4, també diana de la lenalidomida. S'ha estudiat la possibilitat de fer servir l'expressió de cereblon com a marcador de resistència, ja que mostres de pacients de mieloma múltiple resistent a la lenalidomida presenten baixos nivells de la proteïna. L'ús de la immunohistoquímica per detectar els nivells d'expressió de cereblon podria ser una aproximació fiable per predir la resposta als IMiD en pacients de MM. No només això, sinó que s'ha publicat la identificació de 244 *CRBN binding proteins*, de les quals 46 disminueixen després del tractament amb lenalidomida. Dues d'aquestes són factors de transcripció pertanyents a la família Ikaros de proteïnes amb dits de zinc: Ikaros (*IKZF1*) i Aiolos (*IKZF3*). L'anàlisi de línies cel·lulars de mieloma ha revelat que l'efecte terapèutic de la lenalidomida està relacionat necessàriament amb la disminució d'aquestes dues proteïnes. També s'ha descrit que, en un estudi amb 44 pacients de MM refractaris tractats amb pomalidomida i dexametasona, aquells que van mostrar una més baixa expressió del gen *IKZF1* abans del tractament van mostrar també una manca de resposta i una supervivència global més curta, podent fer servir Ikaros com un biomarcador predictiu en la clínica.(145-148)

També el subtipus ABC del limfoma B difús de cèl·lula gran està caracteritzat per un increment de l'expressió d'IRF4. *In vitro*, la lenalidomida disminueix els nivells d'IRF4 i per fer-ho, requereix l'expressió de cereblon. De fet, la depleció per shRNA de *CRBN* redueix la toxicitat induïda per la lenalidomida i interfereix en l'habilitat d'aquesta per induir la resposta d'interferó i el bloqueig de la senyalització de NF- $\kappa$ B.(149, 150)

Un recent estudi en leucèmia limfocítica crònica o CLL (*Chronic Lymphocytic Leukemia*) demostra que el tractament *in vitro* amb la lenalidomida inhibeix la proliferació i que el silenciament de *CDKN1A* (que codifica per p21<sup>CIP1</sup>) impedeix la capacitat de l'IMiD per exercir aquesta acció. En consonància, el silenciament de *CRBN* impedeix la capacitat de la lenalidomida per induir l'expressió de p21<sup>CIP1</sup> i per tant, també d'inhibir la proliferació de les cèl·lules de CLL.(151)

#### **g. Inducció d'apoptosi**

En múltiple mieloma els IMiD indueixen apoptosi mitjançant la disminució de p21<sup>CIP1</sup> i de l'activitat de NF- $\kappa$ B, activant la caspasa-8, potenciant la sensibilitat intervinguda per Fas i disminuint l'expressió de l'inhibidor de l'apoptosi cIAP-2 així com de cFLIP. Els IMiD també són capaços d'inhibir l'efecte prosupervivència d'IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor 1*) i de potenciar l'activitat antimieloide de TRAIL (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*), de la dexametasona, del bortezomib i de l'inhibidor de mTOR rapamicina.(152, 153)



**Figura 17. Mecanismes d'acció de la lenalidomida.** La lenalidomida exerceix el seu efecte antitumoral des de diferents vessants. És capaç d'inhibir la supressió immunològica present en els processos tumorals activant i augmentant el nombre de les cèl·lules T i de les *Natural Killer*, inhibeix les citocines proinflamàtores (com TNF $\alpha$  o IL-6) secretades pels monòcits, bloqueja l'angiogènesi, bloqueja la proliferació tumoral i induïx l'apoptosi de les cèl·lules malignes. També trenca el suport que reben les cèl·lules tumorals des del microambient que les envolta: en el MM la lenalidomida interfereix en el sinergisme entre els osteoclastos, les cèl·lules tumorals i les BMSC: els osteoclastos secreten senyals de supervivència a les cèl·lules tumorals i la lenalidomida disminueix el nombre d'osteoclastos i a més, disminueix les molècules d'adhesió necessàries per l'activació d'aquests. Alhora disminueix l'expressió de gens relacionats amb l'osteoclastogènesi com el factor de transcripció PU.1 i ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinasa*), i disminueix els nivells de molècules d'adhesió en la superfície cel·lular fent que la interacció entre les cèl·lules tumorals i les BMSC es debiliti.(139)

### iii. Combinacions amb altres fàrmacs en el MCL

Per tal d'aconseguir millors resultats en la pràctica clínica els IMiD, i especialment la lenalidomida, són combinats amb altres fàrmacs, ja sigui per

millorar l'activitat antitumoral en el tractament del MCL com per aconseguir un millor perfil tòxic.

**a. Lenalidomida amb rituximab**

La combinació de la lenalidomida amb el rituximab ja va ser estudiada l'any 2009 en el MCL sota la premissa que el rituximab està associat amb la inducció directa de citotoxicitat depenent d'anticossos o ADCC (*Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity*) i que la lenalidomida també realça l'ADCC. *In vitro*, la combinació amb la lenalidomida augmenta l'apoptosi en comparació amb el rituximab com agent únic incrementant la fosforilació de JNK (*c-Jun N-terminal protein Kinases*), Bcl-2 i Bad, augmentant l'alliberació de citocrom C i l'activació de les caspases 3, 8 i 9, així com el clivatge de PARP. La combinació *in vivo* de tots dos fàrmacs inhibeix el creixement tumoral i prolonga la supervivència dels ratolins immunodeprimits SCID inoculats amb cèl·lules de MCL.(154)

Després de les dades preclíniques es va iniciar un assaig clínic de fase I/II amb pacients de MCL refractaris o en recaiguda per determinar la dosi màxima tolerada i l'eficàcia i la seguretat de la combinació. Les dades van confirmar la tolerància a la combinació així com els efectes positius d'aquesta en els pacients.(155)

**b. Lenalidomida amb dexametasona**

Estudis preclínics també van descriure efectes antiproliferatius i apoptòtics sinèrgics en combinar la lenalidomida amb la dexametasona en línies cel·lulars de MCL i en mostres primàries fresques aïllades de pacients en recaiguda o refractaris, sent més acusada la sinergia en el cas de les segones. Principalment, l'efecte apoptòtic sinèrgic ve donat a través de les vies de senyalització mitocondrial, sent fosforilada Bcl-2 i augmentant els nivells de



les proteïnes proapoptòtiques Bax, Bad i Bim, amb la consegüent activació de les caspases 3 i 9 i el clivatge de PARP. Estudis *in vivo* en ratolins van mostrar un retràs en el creixement tumoral i una incrementada supervivència.(156)

Basant-se en les dades anteriors es va desenvolupar un assaig clínic de fase II multicèntric amb pacients refractaris de MCL o en recaiguda. El tractament va comportar un augment significatiu en la densitat de microvasos i també va augmentar el recompte de cèl·lules NK i de macròfags. Tot i els resultats biològics i cel·lulars, la contribució de la dexametasona en l'assoliment d'aquests en pacients de MCL no va ser clara a causa del seu possible efecte perjudicial relacionat amb la supressió de la immunitat cel·lular, el que explicaria perquè no es van aconseguir millors resultats en aquest estudi amb la combinació que en altres on només era administrada la lenalidomida.(157)

### **c. Triple combinació de lenalidomida, rituximab i dexametasona**

Per tal de comprovar l'eficàcia de la lenalidomida combinada alhora amb el rituximab i la dexametasona es va iniciar un assaig clínic de fase II en pacients de MCL refractari o en recaiguda i resistent a rituximab. En la primera part, els pacients rebien 2 cicles de lenalidomida diària i dexametasona setmanal i després, durant el tercer cicle, a més, rebien dosis setmanals de rituximab. En la segona part, els pacients que havien respost van continuar rebent lenalidomida i dexametasona. La combinació dels tres fàrmacs va aconseguir tasses de resposta elevades amb respostes duradores. A més, la tasa de resposta global es va augmentar del 29 % al 58 % en afegir el rituximab després dels dos cicles amb la lenalidomida i dexametasona, suggerint que la lenalidomida és capaç de superar la resistència al rituximab.(158)

**d. Lenalidomida amb bortezomib**

La combinació de la lenalidomida i el bortezomib s'ha estudiat en un assaig clínic de fase II en el que s'ha determinat que, tot i que la resposta de la combinació va ser similar a la dels agents per separat, l'increment de la toxicitat amb aquest règim fa que no es recomanin més estudis amb dosis similars a les emprades en aquest.(123, 159)



OBJECTIUS



1.

El primer objectiu d'aquesta tesi doctoral desenvolupat en els dos primers treballs (en col·laboració amb el grup de la Dra. Brigitte Sola de l'Université de Caen Basse-Normandie a França), està relacionat amb el complex ciclina D1-p27<sup>KIP1</sup> incloent el següent:

- Estudi del rol del complex ciclina D1-p27<sup>KIP1</sup> en el cicle cel·lular en el limfoma de cèl·lules del mantell.
- Estudi de les conseqüències de la inhibició d'aquest complex mitjançant la lenalidomida.

2.

El segon objectiu, presentat en el tercer treball, està basat en la resistència a bortezomib en el limfoma de cèl·lules del mantell i l'estudi i la validació de teràpies per tal de superar aquesta resistència:

- Validació *in vivo* de la diferenciació plasmocítica com a mecanisme de resistència a bortezomib en el limfoma de cèl·lules del mantell.
- Estudi de l'activitat terapèutica de la lenalidomida *in vitro* i *in vivo* en aquest model, en relació amb la inhibició del procés de diferenciació plasmocítica.
- Estudi de la combinació de la lenalidomida amb altres fàrmacs per tal de millorar la seva activitat, incloent-hi el bortezomib i un nou inhibidor de proteïnes BET.



# RESULTATS





## **Primer treball**

*Moros A<sup>1</sup>, Bustany S<sup>3</sup>, Cahu J<sup>3</sup>, Saborit-Villarroya I<sup>1</sup>, Martínez A<sup>2</sup>, Colomer D<sup>1,2</sup>, Sola B<sup>3</sup>, Roué G<sup>1</sup>.*

Antitumoral activity of lenalidomide in *in vitro* and *in vivo* models of mantle cell lymphoma involves the destabilization of cyclin D1/p27<sup>KIP1</sup> complexes.

**Clin Cancer Res.** 2014 Jan 15;20(2):393-403. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1569.

*1 Hemato-oncology Department, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain*

*2 Hematopathology Unit, Hospital Clínic, Barcelona, Spain*

*3 Normandie Univ, UNICAEN, MILPAT, Caen, France*



L'activitat antitumoral de la lenalidomida en models de limfoma de cèl·lules del mantell *in vitro* i *in vivo* comporta la desestabilització dels complexos de ciclina D1/p27<sup>KIP1</sup>.

**Objectiu:** S'ha observat resposta clínica al fàrmac immunomodulador lenalidomida en pacients de limfoma de cèl·lules del mantell refractaris i/o amb recaigudes, encara que el seu mecanisme d'acció encara roman parcialment desconegut. Vàrem investigar si l'expressió i la localització subcel·lular de la ciclina D1, un important regulador del cicle cel·lular sobreexpressat en el MCL, i l'inhibidor de cinases dependents de ciclines, p27<sup>KIP1</sup> podrien identificar casos de MCL sensibles a la lenalidomida, i si el fàrmac podria modular els complexos de ciclina D1/p27<sup>KIP1</sup> en les cèl·lules de MCL.

**Disseny experimental:** mostres primàries de MCL així com línies cel·lulars van ser analitzades per mesurar els nivells subcel·lulars de complexos ciclina D1/p27<sup>KIP1</sup> per *Western blot*, immunohistoquímica, immunoprecipitació i citometria de flux. L'activitat de la lenalidomida *in vitro* i el seu efecte sobre els complexos ciclina D1/p27<sup>KIP1</sup> van ser avaluats per PCR en temps real, immunoprecipitació, immunofluorescència i *Western blot*. La validació *in vivo* es va portar a terme mitjançant un model de xenotrasplantament de MCL humà en ratolí.

**Resultats:** vàrem trobar que la ciclina D1 i p27<sup>KIP1</sup> s'expressaven de forma coordinada en tots els casos testats de MCL. Les anàlisis d'immunoprecipitació i els assajos de siRNA van suggerir un rol directe de la ciclina D1 en la regulació dels nivells de p27<sup>KIP1</sup>. L'acumulació nuclear de totes dues proteïnes va correlacionar amb la tumorigenicitat del MCL *in vivo*, i la sensibilitat a l'activitat de la lenalidomida *in vitro* i *in vivo*. El mecanisme

d'acció de la lenalidomida va dependre de la depleció de la ciclina D1 i de la dissociació dels complexos ciclina D1/p27<sup>KIP1</sup>, seguida de l'acumulació citosòlica de p27<sup>KIP1</sup>, aturada de cicle, apoptosi i inhibició de l'angiogènesi.

**Conclusions:** aquests resultats revelen un mecanisme d'acció de la lenalidomida en casos de MCL amb una incrementada tumorigenicitat *in vivo* que consisteix en la dissociació dels complexos ciclina D1/p27<sup>KIP1</sup> i el subseqüent bloqueig de la proliferació i la inducció d'apoptosi.

# Clinical Cancer Research



## Antitumoral Activity of Lenalidomide in *In Vitro* and *In Vivo* Models of Mantle Cell Lymphoma Involves the Destabilization of Cyclin D1/p27<sup>KIP1</sup> Complexes

Alexandra Moros, Sophie Bustany, Julie Cahu, et al.

*Clin Cancer Res* 2014;20:393-403. Published OnlineFirst October 31, 2013.

**Updated version** Access the most recent version of this article at:  
[doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1569](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-1569)

**Supplementary Material** Access the most recent supplemental material at:  
<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/suppl/2013/10/31/1078-0432.CCR-13-1569.DC1.html>

**Cited Articles** This article cites by 34 articles, 13 of which you can access for free at:  
<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/20/2/393.full.html#ref-list-1>

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

**Reprints and Subscriptions** To order reprints of this article or to subscribe to the journal, contact the AACR Publications Department at [pubs@aacr.org](mailto:pubs@aacr.org).

**Permissions** To request permission to re-use all or part of this article, contact the AACR Publications Department at [permissions@aacr.org](mailto:permissions@aacr.org).

## Antitumoral Activity of Lenalidomide in *In Vitro* and *In Vivo* Models of Mantle Cell Lymphoma Involves the Destabilization of Cyclin D1/p27<sup>KIP1</sup> Complexes

Alexandra Moros<sup>1</sup>, Sophie Bustany<sup>3</sup>, Julie Cahu<sup>3</sup>, Ifigènia Saborit-Villarroya<sup>1</sup>, Antonio Martínez<sup>2</sup>, Dolores Colomer<sup>1,2</sup>, Brigitte Sola<sup>3</sup>, and Gaël Roué<sup>1</sup>

### Abstract

**Purpose:** Clinical responses to the immunomodulatory drug lenalidomide have been observed in patients with relapsed/refractory mantle cell lymphoma (MCL), although its mechanism of action remains partially unknown. We investigated whether the expression and subcellular localization of cyclin D1, a major cell-cycle regulator overexpressed in MCL, and the cyclin-dependent kinase inhibitor p27<sup>KIP1</sup>, could identify MCL cases sensitive to lenalidomide, and whether the compound could modulate cyclin D1/p27<sup>KIP1</sup> complexes in MCL cells.

**Experimental Design:** MCL primary samples and cell lines were analyzed for subcellular levels of cyclin D1/p27<sup>KIP1</sup> complexes by Western blot, immunohistochemistry, immunoprecipitation, and flow cytometry. Activity of lenalidomide *in vitro* and its effect on cyclin D1/p27<sup>KIP1</sup> complexes were evaluated by real-time PCR, immunoprecipitation, immunofluorescence, and Western blot. *In vivo* validation was carried out in a mouse xenograft model of human MCL.

**Results:** We found cyclin D1 and p27<sup>KIP1</sup> to be coordinately expressed in all the MCL samples tested. Immunoprecipitation analyses and siRNA assays suggested a direct role of cyclin D1 in the regulation of p27<sup>KIP1</sup> levels. The nuclear accumulation of both proteins correlated with MCL cell tumorigenicity *in vivo*, and sensitivity to lenalidomide activity *in vitro* and *in vivo*. Lenalidomide mechanism of action relied on cyclin D1 downregulation and disruption of cyclin D1/p27<sup>KIP1</sup> complexes, followed by cytosolic accumulation of p27<sup>KIP1</sup>, cell proliferation arrest, apoptosis, and angiogenesis inhibition.

**Conclusions:** These results highlight a mechanism of action of lenalidomide in MCL cases with increased tumorigenicity *in vivo*, which is mediated by the dissociation of cyclin D1/p27<sup>KIP1</sup> complexes, and subsequent proliferation blockade and apoptosis induction. *Clin Cancer Res*; 20(2); 393–403. ©2013 AACR.

### Introduction

Mantle cell lymphoma (MCL) is an aggressive lymphoid neoplasm that accounts for 5% to 10% of all B-cell non-Hodgkin lymphomas. It is genetically characterized by the chromosomal translocation t(11;14)(q13;q32), resulting in the overexpression of cyclin D1. Moreover, high levels of chromosomal instability because of the disruption of the

DNA damage response pathway associated with the abnormal activation of cell survival mechanisms may confer an aggressive clinical course to the disease (1). Standard chemotherapy approaches are frequently used, but long-term remissions are rare. After failure of first- or second-line treatments, various single agents are used despite limited response rates (2). Thus, there is still a strong unmet medical need for new treatment options in MCL.

Promising results were achieved in a subset of relapsed MCL patients with a selective cyclin-dependent kinase (CDK) 4/6 inhibitor. However, this strategy seems to be insufficient for long-term disease control (3). In this line, preclinical studies have proposed that CDK-independent functions of cyclin D1 may account for its oncogenic and antiapoptotic properties (4), suggesting that other(s) partner(s) of cyclin D1 could represent attractive therapeutic targets. Among these partners, the CDK inhibitor p27<sup>KIP1</sup> is strongly expressed in the highly proliferative and aggressive blastoid MCL variants while is only present in a minority of the good prognosis and low proliferative MCL tumors (5–7). It was thus proposed that mantle cell lymphomagenesis may result, at least in part, from the

**Authors' Affiliations:** <sup>1</sup>Hemato-oncology Department, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS); <sup>2</sup>Hematopathology Unit, Hospital Clinic, Barcelona, Spain; and <sup>3</sup>Normandie Univ, UNICAEN, MILPAT, Caen, France

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

A. Moros and S. Bustany contributed equally to this work.

B. Sola and G. Roué share the senior authorship of this article.

**Corresponding Author:** Gaël Roué, IDIBAPS, Hemato-oncology Department, Rosselló, 153, 08036 Barcelona, Spain. Phone: 34-932275400, ext. 4525; Fax: 34-933129407; E-mail: groue@clinic.ub.es

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1569

©2013 American Association for Cancer Research.

### Translational Relevance

Mantle cell lymphoma (MCL) is an aggressive hematological neoplasm that lacks effective therapy. MCL cells express high level of cyclin D1, a major cell-cycle regulator recently shown to be involved in MCL resistance to chemotherapeutic-induced cell death. However, the pharmacological targeting of cyclin D1/cyclin-dependent kinase (CDK) complexes has shown modest activity in the clinical settings. Here, we find a tight correlation between contents of cyclin D1 and the CDK inhibitor p27<sup>KIP1</sup>, underlying the sequestration of this latest in cyclin D1/CDK4 complexes, and protection from degradation. We show this phenomenon to be associated with increased tumorigenicity of MCL cells *in vivo*, and describe the possibility to counteract this process by using the thalidomide derivative, lenalidomide. Lenalidomide efficiently disrupts cyclin D1/p27<sup>KIP1</sup> complexes, thus reducing tumor growth and angiogenesis and inducing apoptosis in a MCL xenotransplant model. This study thus provides evidences of lenalidomide efficacy in aggressive, cyclin D1/p27<sup>KIP1</sup>-driven MCL tumors.

ability of the overexpressed cyclin D1 to buffer changes of p27<sup>KIP1</sup> levels, thereby rendering ineffective the p27<sup>KIP1</sup>-mediated inhibition of cellular growth (8). Therefore, the role of p27<sup>KIP1</sup> in the pathogenesis of MCL remains controversial.

Although no drug has been shown so far to specifically modulate p27<sup>KIP1</sup> expression/activity in MCL, the immunomodulatory agent lenalidomide has been shown to regulate p27<sup>KIP1</sup> levels in multiple myeloma cell lines and patient cells (9). This structural analogue of thalidomide approved by the U.S. Food and Drug Administration for the treatment of multiple myeloma, myelodysplastic syndromes, and relapsed/refractory MCL is also currently under active investigation with promising results for the treatment of chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphomas including MCL, in combination with steroids or rituximab/bendamustine (10). Lenalidomide treatment leads to enhanced proliferative and functional capacity of T lymphocytes, activation of effector responses, and suppression of inflammation (11). Although lenalidomide shows superior safety and efficacy relative to thalidomide, its mechanism of action remains partially unknown.

We reported previously that the overexpression of cyclin D1 in pro-B leukemic cells does not induce p27<sup>KIP1</sup> relocalization from the nucleus to the cytoplasm but rather induces its sequestration of in trimeric complexes with cyclin D1 and CDK4, thereby regulating its stability (12). Here, we investigated whether the CDK inhibitor exerted similar functions in MCL cells, and the impact of cyclin D1/p27<sup>KIP1</sup> complex formation on MCL cell growth and response to lenalidomide in both *in vitro* and *in vivo* settings.

### Patients, Materials, and Methods

#### Isolation and culture of primary cells

Cells from 13 previously untreated MCL patients, diagnosed according to the World Health Organization classification criteria (13), were used. Informed consent was obtained from each patient in accordance with the guidelines of the Ethical Committee of the Hospital Cl  nico in Barcelona, Spain, the CHU Côte de Nacre, Caen, France, and the Declaration of Helsinki. The clinical characteristics of patients are listed in Table 1. Mononuclear cells from peripheral blood samples (PBMC) were isolated by Ficoll/hypaque sedimentation (GE Healthcare), and conserved within the Biobank of our institutions (Hematopathology collection from IDIBAPS Biobank and the tumor library of Basse-Normandie, CHU Caen). Cells were either used directly or cryopreserved in liquid nitrogen in the presence of 10% dimethyl sulfoxide, 60% FBS, and 30% RPMI 1640. All samples contained more than 80% of CD19<sup>+</sup>/CD5<sup>+</sup> malignant lymphocytes, as assessed by flow cytometry.

#### Cell lines

Six previously described human MCL cell lines (Z-138, ZBR, Jeko-1, JBR, Rec-1, and JVM-2; ref. 14) were used in this study. Cell lines were grown in RPMI 1640 or Dulbecco's Modified Eagle's Medium, supplemented with 10% to 20% heat-inactivated FBS, 2 mmol/L glutamine, 50 µg/mL penicillin-streptomycin (Life Technologies) and maintained in a humidified incubator at 37°C with 5% carbon dioxide. All cultures were routinely tested for *Mycoplasma* infection by PCR and the identity of all cell lines was verified by using AmpFISTR identifier kit (Life Technologies).

#### Detection of p27<sup>KIP1</sup> and cyclin D1 proteins in MCL primary samples by flow cytometry

Primary MCL cells (10<sup>6</sup>) were washed in phosphate-buffered saline (PBS) and permeabilized with Perm & Stab reagent (Beckman Coulter). Cells were labeled with anti-cyclin D1 (M-20) or anti-p27<sup>KIP1</sup> (C-19; Santa Cruz Biotechnology) antibodies (Abs) for 30 minutes, washed in PBS, and then labeled with Alexa Fluor 647-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin G (IgG; Life Technologies) before being washed and fixed in PBS/PFA 0.5% solution. As a negative control, cells were labeled only with the secondary antibody. Cellular fluorescence of at least 10<sup>4</sup> events was analyzed with a Gallios cytometer and data with the Kaluza software (Beckman Coulter).

#### Apoptosis detection by annexin V labeling

Cells were treated with 1 µmol/L lenalidomide (kindly provided by Celgene) for 72 hours, and the percentage of apoptotic cells was quantified by staining with annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC) and propidium iodide (Bender Medsystems) as described (15). A total of 10<sup>4</sup> stained cells per sample were acquired and analyzed in an Attune acoustic focusing cytometer using Attune software (Life Technologies).



**Table 1.** Characteristics of MCL patients

Patient no.	Age/gender <sup>a</sup>	Histologic variant	Cell source <sup>b</sup>	% Tumoral cells <sup>c</sup>
#1	77/M	Classical	Spleen	80
#2	79/M	Classical	PB	85
#3	56/M	Blastoid	PB	80
#4	79/M	Classical	PB	95
#5	85/M	Classical	PB	85
#6	79/M	Classical	PB	91
#7	61/M	Classical	LN	91
#8	74/F	Classical	PB	81
#9	76/M	Classical	LN	95
#10	80/M	Classical	PB	89
#11	70/M	Classical	PB	93
#12	63/M	Classical	PB	86
#13	72/F	Classical	LN	91

<sup>a</sup>M, male; F, female.<sup>b</sup>Source of the cells used in the *in vitro* analysis; PB, peripheral blood; LN, lymph node.<sup>c</sup>% of tumor cells quantified by flow cytometry.**Immunohistochemical analysis of MCL cell lines**

MCL cell cultures ( $5 \times 10^7$  cells per line) were washed once in PBS and resuspended in 200  $\mu$ L of a mix (v/v) of human thrombin (Sigma) and freshly isolated human plasma. Once solidified, cell pellets were formalin-fixed before paraffin embedding on silane-coated slides in a fully automated immunostainer (Bond Max; Leica Microsystems). Immunohistochemical studies were performed on consecutive tissue sections as previously described (14) using anti-phospho(p)-histone H3 (Epitomics), anti-cyclin D1 (EP12), or anti-p27<sup>KIP1</sup> (sx53g8; Dako) primary Abs. Preparations were evaluated with an Olympus DP70 microscope by means of a 40 $\times$ /0.75 NA objective and DPManager software v2.1.1 (Olympus).

**Immunofluorescence**

Cyclin D1 and p27<sup>KIP1</sup> expression was determined by fluorescence microscopy in Rec-1 cells untreated or treated with 1  $\mu$ M lenalidomide. Cells ( $5 \times 10^5$ ) were fixed on poly-L-lysine-coated glass coverslips with 4% paraformaldehyde, permeabilized with a solution containing 0.1% saponin and 10% FBS, and labeled with anti-cyclin D1 (DCS-6; Cell Signaling Technology), anti-p27<sup>KIP1</sup> (C-19; Santa Cruz Biotechnology), or anti-p27<sup>KIP1</sup>-phospho(p) Thr198 (R&D Systems) Abs, followed by appropriate anti-mouse-tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC) or anti-rabbit-FITC (Sigma) secondary Abs. Coverslips were mounted on glass slides with DAPI-containing Fluoroshield mounting medium (Sigma) and visualized on a Nikon H5505 microscope by means of a 100 $\times$ /1.30 NA oil objective (Nikon) with the use of Isis Imaging System v5.3 software (MetaSystems GmbH).

**Immunoprecipitation and Western blotting**

Whole protein extracts were obtained by cell lysis in Triton buffer (20 mmol/L Tris-HCl pH 7.6, 150 mmol/L

NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1% Triton X-100) supplemented with protease and phosphatase inhibitors (10 mg/mL leupeptin, 10 mg/mL aprotinin, 1 mmol/L phenylmethanesulfonyl fluoride, 5 mmol/L NaF, and 2 mmol/L Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>). For cyclin D1 and p27<sup>KIP1</sup> immunoprecipitation,  $3 \times 10^7$  cells were resuspended in immunoprecipitation buffer (10 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA, 20% glycerol, and protease/phosphatase inhibitors as above) and incubated for 15 minutes on ice. Cells were centrifuged for 15 minutes at 16,000  $\times$  g and the supernatants were recovered. Then, 500  $\mu$ g of proteins were incubated overnight at 4°C with 2  $\mu$ g cyclin D1 (M-20) or p27<sup>KIP1</sup> (C-19; Santa Cruz Biotechnology) Abs. Protein A-agarose beads (50  $\mu$ L; Roche) were then added and the mixture was incubated for 1 hour at 4°C. Beads were washed 3 times in immunoprecipitation buffer, resuspended in 20  $\mu$ L of Laemmli buffer before SDS-PAGE. Cytosolic and nuclear extracts were prepared from  $5 \times 10^6$  cells with the BioVision nuclear/cytosol fractionation kit as recommended by the supplier. Fifty micrograms of proteins were loaded onto 12% to 15% SDS-PAGE and transferred to an Immobilon-P membrane (Millipore). Membranes were probed with Abs against p27<sup>KIP1</sup> (C-19) and CDK4 (C-22; Santa Cruz Biotechnology), cyclin D1 (DSC-6) and active caspase-3 (5A1E; Cell Signaling Technology), and p27<sup>KIP1</sup>-pThr198 (R&D Systems). Equal protein loading was confirmed by analyzing  $\beta$ -tubulin or  $\beta$ -actin (Sigma) expression. Purity of cytosolic and nuclear fractions was checked by incubating membranes with anti-Grp78/BIP (Cell Signaling Technology) and anti-PARP (Roche) Abs, respectively. Membranes were incubated with horseradish peroxidase-labeled anti-mouse (Sigma), anti-rabbit (Cell Signaling Technology), or anti-rat (Santa Cruz Biotechnology) secondary Abs. Chemiluminescence detection was done by using ECL system (Pierce) in a mini-LAS4000 (Fujifilm)

or FluorImager (Bio-Rad) device and densitometry analyses were performed with Image Gauge (Fujifilm) or QuantityOne software (Bio-Rad), respectively.

#### Determination of protein half-life

MCL cells were cultured in the presence of 50 ng/mL cycloheximide (CHX; Sigma) for 0 to 180 minutes and then harvested. Whole cell extracts were analyzed by SDS-PAGE as previously. The density of each band was measured with FluorImager and QuantityOne software (Bio-Rad). p27<sup>KIP1</sup> or cyclin D1 half-life was deduced from the semi-log curve: time/f(p27<sup>KIP1</sup> or cyclin D1/ $\beta$ -actin or  $\beta$ -tubulin ratio).

#### RNA interference assay

Jeko-1 cells ( $10^7$ ) were electroporated (250 V, 950  $\mu$ F; Gene Pulser II; Bio-Rad) with 750 nmol/L control (sc-37007; Santa Cruz Biotechnology) or cyclin D1 siRNAs [r(UGA CCC CGC ACG AUU UCA U)d(TT); r(AUG AAA UCG UGC GGG GUC A)d(TT); Qiagen] in RPMI 1640 medium without FBS, cultured 48 hours in complete medium and harvested thereafter. Whole cell lysates were obtained and analyzed by immunoblotting with anti-cyclin D1, anti-p27<sup>KIP1</sup>, and anti- $\beta$ -tubulin Abs as before. Densitometry analyses were performed as before.

#### Real-time PCR

Total RNA was extracted using TRIZOL (Life Technologies) following manufacturer's instructions. One microgram of RNA was retrotranscribed to cDNA with M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen) and random hexamer primers (Roche). Cyclin D1 and p27<sup>KIP1</sup> mRNA expression was analyzed in duplicate by quantitative real-time PCR on the Step one system (Applied Biosystems) by using pre-designed Assay-on-Demand probes (Applied Biosystems). The relative expression of each gene was quantified by the comparative cycle threshold ( $C_t$ ) method ( $\Delta\Delta C_t$ ) by using  $\beta$ -actin as endogenous control. Expressions levels are given using control untreated cells as a calibrator.

#### Xenograft mouse model and tumor phenotyping

With the use of a protocol approved by the animal testing ethical committee of the University of Barcelona, CB17-severe combined immunodeficient (SCID) mice (Charles River) were inoculated subcutaneously into their lower dorsum with the indicated MCL cell line ( $10^7$  cells per mice) in Matrigel (1:1; Becton Dickinson). Twenty-three days postinoculation, animals were killed according to institutional guidelines, and tumor xenografts were extirpated. For the lenalidomide protocol, mice-bearing JBR tumors were randomly assigned into cohorts of 4 mice each at day 8, when tumors were palpable. Then, animals received a daily intraperitoneal injection of 10 mg/kg lenalidomide or an equal volume of vehicle for 3 weeks. The shortest (s) and longest (l) diameters of the tumor were measured with external calipers and tumor volume (in mm<sup>3</sup>) was calculated with the use of the following standard formula:  $s^2 \times l \times 0.5$ . Tumor samples

were snap-frozen in OCT medium (Sakura Tissue Tek) or formalin fixed and included in paraffin. Tissue sections were stained for p-histone H3, cyclin D1, and p27<sup>KIP1</sup> as above, or using antiplatelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1, M20; Santa Cruz Biotechnology) or anti-caspase-3 cleaved (5A1E; Cell Signaling Technology) primary Abs, followed by evaluation with an Olympus DP70 microscope. Total protein extracts from cryopreserved tumor samples were obtained as previously described (14) and analyzed by SDS-PAGE as above for p27<sup>KIP1</sup>-pThr198 and activated caspase-3 levels.

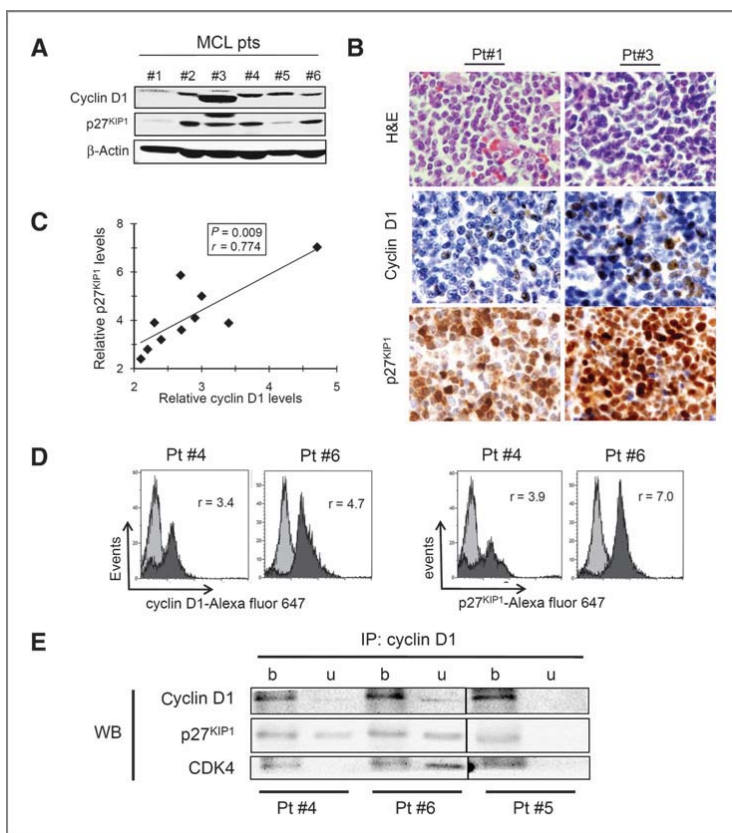
#### Statistical analysis

Presented data are the means  $\pm$  SD or SEM of 3 independent experiments. All statistical analyses were done by using GraphPad Prism 4.0 software (GraphPad Software). Comparison between 2 groups of samples was evaluated by nonparametric Mann-Whitney test to determine how response is affected by 2 factors. Pearson test was used to assess statistical significance of correlation. Results were considered statistically significant when  $P$  value  $< 0.05$ .

## Results

### p27<sup>KIP1</sup> and cyclin D1 are simultaneously expressed and interact in MCL cells

We assessed the protein levels of p27<sup>KIP1</sup> and cyclin D1 by Western blot in a set of 6 MCL samples, including a blastoid case. As shown in Fig. 1A, although both cyclin D1 and p27<sup>KIP1</sup> were present at variable levels in all the patients analyzed, the blastoid case (Pt #3) harbored higher levels of the 2 proteins, when compared with the conventional cases. The nuclear accumulation of the 2 proteins was detectable by immunohistochemistry in tumor specimens from both conventional and blastoid cases, but at increased levels in cells from the blastoid MCL patient (25% vs. 9% cyclin D1-positive nuclei and 94% vs. 34% p27<sup>KIP1</sup>-positive nuclei between Pt#3 and Pt#1, respectively; Fig. 1B and Supplementary Fig. S1A). We developed an immunolabeling protocol for accurate detection and quantification of these proteins by flow cytometry and observed a significant correlation ( $r = 0.774$ ,  $**P = 0.009$ ) between intracellular p27<sup>KIP1</sup> and cyclin D1 protein contents in an extended series of 10 MCL primary cases (Fig. 1C; Supplementary Fig. S2A). In addition, the calculation of the ratio ( $r$ ) between the mean fluorescence intensity of cyclin D1- and p27<sup>KIP1</sup>-positive cells and isotypic control-stained cells allowed observing differences between patients with apparent similar levels of both proteins by Western blot. This could be observed between the representative patients #4 and #6 (Fig. 1D compared with Fig. 1A). Independently of the level of each protein, p27<sup>KIP1</sup> protein was present in cyclin D1/CDK4 complexes in 3 representative cases (Pts #4–6; Fig. 1E), in accordance with previous studies (8). Altogether, these results confirm the existence of a physical interaction of cyclin D1 and p27<sup>KIP1</sup> that may underlie the coexpression of both proteins in MCL primary samples, independently of the MCL subtype.



**Figure 1.** Cyclin D1 and p27<sup>KIP1</sup> interact in MCL primary samples. **A**, whole cell extracts were prepared and analyzed by SDS-PAGE. Blots were revealed with anti-p27<sup>KIP1</sup>, anti-cyclin D1, and anti- $\beta$ -actin (as loading control) antibodies. Experiments have been repeated 3 times, a representative one is shown. **B**, immunohistochemical staining for cyclin D1 and p27<sup>KIP1</sup> in consecutive sections of cell blocks from 2 MCL patients (800 $\times$  magnification). **C**, primary cells from MCL patients ( $n = 10$ ) were labeled with anti-cyclin D1 or anti-p27<sup>KIP1</sup> antibodies then with anti-rabbit IgG Alexa Fluor 647. Isotypic control was prepared without primary antibody. Stained cells were analyzed by flow cytometry and mean fluorescence intensity ratios ( $r$  values) between p27<sup>KIP1</sup> or cyclin D1 positive cells and their respective isotypic controls were calculated.  $r$  values corresponding to p27<sup>KIP1</sup> expression were then plotted against the  $r$  values of cyclin D1 staining. Statistical analysis was performed using Pearson test. **D**, results from flow cytometry analysis of 2 representative patients, indicating the respective  $r$  values from cyclin D1 and p27<sup>KIP1</sup> staining. In gray, isotypic control curves; in black, cyclin D1 or p27<sup>KIP1</sup> curves. **E**, cyclin D1 complexes were immunoprecipitated (IP) from 3 representative primary MCL cultures and analyzed by Western blots for the presence of p27<sup>KIP1</sup>, cyclin D1, and CDK4 (as a control of immunoprecipitation) in both cyclin D1-bound (b) and cyclin D1-unbound (u) fractions.

### High levels of cyclin D1 and p27<sup>KIP1</sup> are associated with increased tumorigenicity of MCL *in vivo*

Previous studies have shown that increased nuclear levels of both cyclin D1 and p27<sup>KIP1</sup> are encountered mainly in the blastoid MCL cell lines albeit with no direct relation with the proliferation rates (8). We assessed the expression and subcellular localization of these 2 proteins by immunohistochemistry in a set of 6 MCL cell lines, including 2 cell lines with induced drug resistance to bortezomib (JBR and ZBR; ref. 14). As shown in Fig. 2A, all cell lines expressed both proteins in the nucleus and the cytoplasm. The nuclear

contents of cyclin D1, p27<sup>KIP1</sup>, as well as the mitotic-associated antigen phospho-histone H3 revealed 2 main groups of tumors. The first group includes Rec-1, JBR, and ZBR cells, where the 3 proteins were highly expressed, mainly in the nucleus. In these cells, cyclin D1 and p27<sup>KIP1</sup> were detected in 95% and 76% of the nuclei, respectively, when compared with the second group composed by Jeko-1, JVM-2, and Z-138 showing an average of 55% cyclin D1- and 41% p27<sup>KIP1</sup>-positive nuclei, respectively (Fig. 2A and Supplementary Fig. S1B). The interaction between cyclin D1 and p27<sup>KIP1</sup> was similar between the

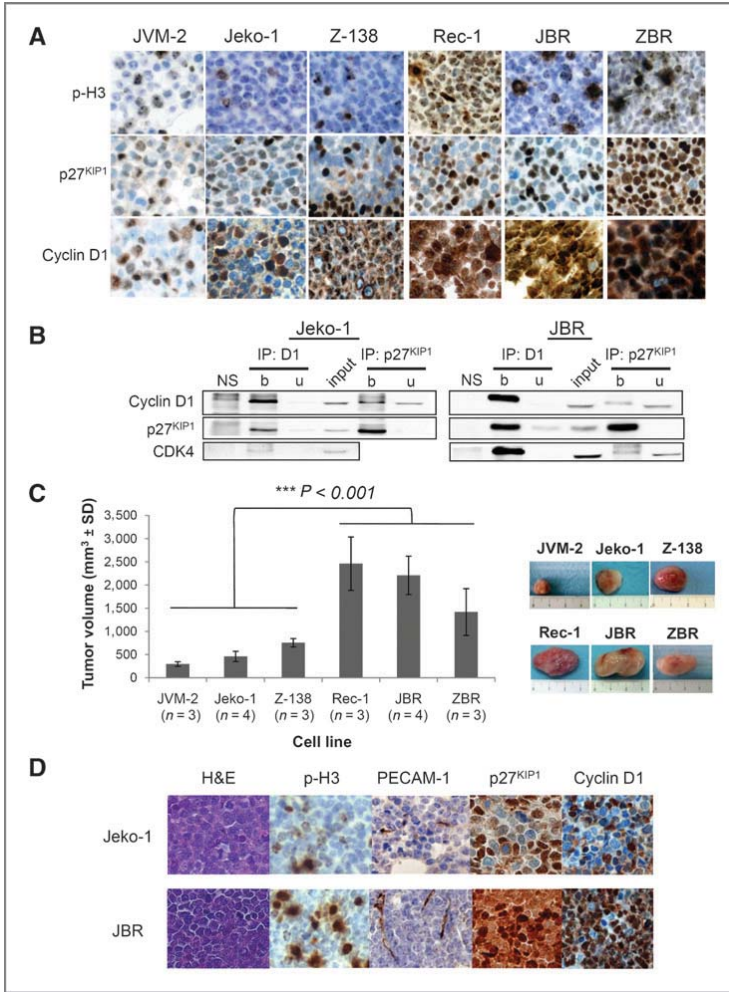


Figure 2. Increased cyclin D1 and p27<sup>KIP1</sup> complexes are associated with increased tumorigenicity *in vivo*. A, immunohistochemical validation of increased mitotic index (p-histone H3), p27<sup>KIP1</sup>, and cyclin D1 expression in 6 MCL cell lines (800× magnification). B, whole cell extracts were prepared from Jeko-1 and JBR cells and immunoprecipitated with anti-cyclin D1 or anti-p27<sup>KIP1</sup> antibodies or rabbit nonimmune serum (NS) as control. Total cell extract was analyzed in parallel (input). Proteins were separated by SDS-PAGE. C, MCL cell lines were subcutaneously inoculated in SCID mice (10<sup>7</sup> cells per mouse) and tumor growth was recorded for 23 days. The tumor volume means from the 6 different MCL cell lines are indicated on the graph. Statistical analyses were performed using Student *t* test for matched pairs. D, immunohistochemical analysis of increased mitotic index (phospho-histone H3) and tumor angiogenesis (PECAM-1), p27<sup>KIP1</sup>, and cyclin D1 expression in bortezomib-resistant (JBR) versus bortezomib-sensitive tumors (Jeko-1; 800× magnification).

2 groups of cell lines, as shown in the representative Jeko-1 and JBR cell lines (Fig. 2B). To assess the possible implication *in vivo* of increased cyclin D1/p27<sup>KIP1</sup> complexes, this set of cell lines was subcutaneously inoculated in immunosuppressed mice and tumor burden was evaluated after 23 days. As shown in Fig. 2C, a significant increase in tumor volume was observed in mice inoculated with the subgroup of cells with higher cyclin D1/p27<sup>KIP1</sup> content. Representative tumor sections from Jeko-1 and JBR cells were studied by immunohistochemistry and demonstrated a remarkable nuclear accumulation of cyclin D1 and p27<sup>KIP1</sup> in JBR tumors together with an increased mitotic index, as illustrated in Fig. 2D. Interestingly, this was associated with a

higher tumor vascularization as shown by increased labeling of PECAM-1 (also known as CD31), in accordance with the previously reported role of cyclin D1 in tumor angiogenesis (16).

Altogether, these data suggest that, by contrast with solid tumors (17, 18), the overexpression of cyclin D1 in MCL cells is not associated with the cytoplasmic relocalization of p27<sup>KIP1</sup>, and that cases with higher contents in both proteins are more susceptible to generate fast growing tumors *in vivo*.

**p27<sup>KIP1</sup> is stabilized upon its binding to cyclin D1**

p27<sup>KIP1</sup> is an unstable protein, which is rapidly degraded by the proteasome pathway after its dissociation from

cyclin/CDK complexes (19). As reported previously in another B-cell model (12), we hypothesized that p27<sup>KIP1</sup> could be stabilized by its binding to cyclin D1 in MCL cells. To explore this hypothesis, Jeko-1 cells were transfected with either nonrelevant, scramble siRNA, or cyclin D1-specific siRNA, and levels of both proteins were assessed 48-hour posttransfection. As shown in Fig. 3A, a 35% decrease of cyclin D1 level resulted in a remarkable downregulation of p27<sup>KIP1</sup> level closed to 60%. In line with this, in the 4 representative cell lines Jeko-1, Rec-1, JBR, and Z-138, cyclin D1 half-life was always shorter than p27<sup>KIP1</sup> half-life, suggesting that the degradation of p27<sup>KIP1</sup> occurred after the degradation of cyclin D1 (Fig. 3B and C and Supplementary Fig. S2B). This was confirmed

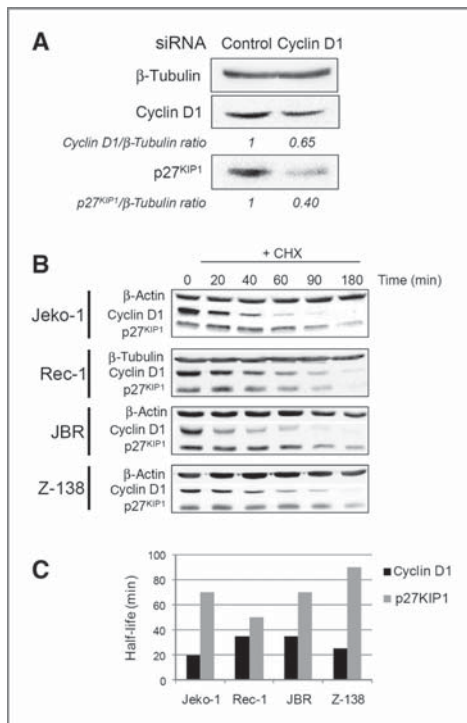
in a B-cell lymphoma cell line transduced with a TAT-cyclin D1 fusion protein, where we found that the degradation of p27<sup>KIP1</sup> occurred after the degradation of cyclin D1 (Supplementary Fig. S2C). Altogether, these data argued in favor of a direct role of cyclin D1 in p27<sup>KIP1</sup> protection from proteasomal degradation resulting in p27<sup>KIP1</sup> stabilization.

### Lenalidomide disrupts cyclin D1/p27<sup>KIP1</sup> complexes *in vitro*

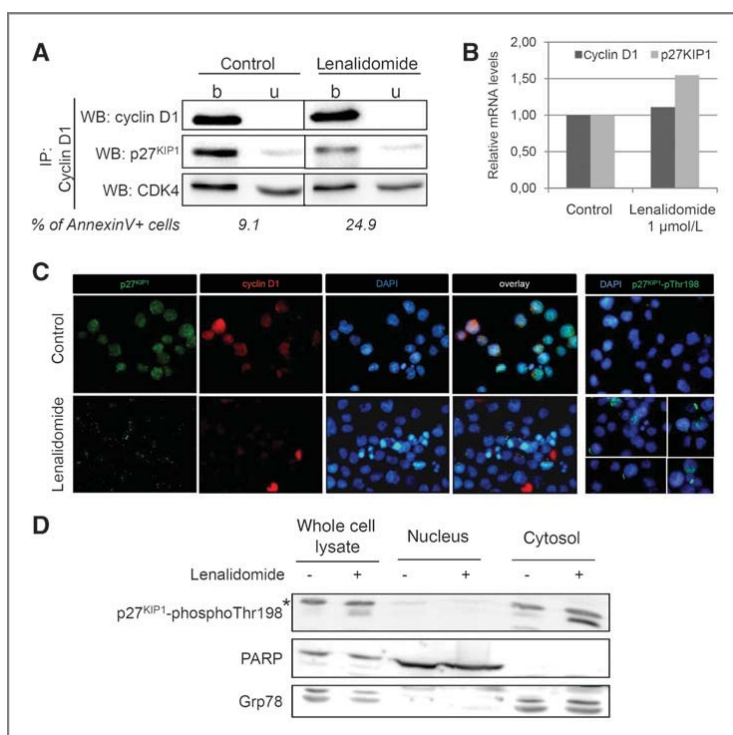
The inhibition of  $\beta$ -catenin/cyclin D1 signaling has been recently involved in the mechanism of action of the immunomodulatory drug lenalidomide in multiple myeloma cells (20). To gain insights into the role of cyclin D1/p27<sup>KIP1</sup> interaction in MCL cell proliferation and tumor growth, we assessed the capacity of lenalidomide to downregulate cyclin D1 in MCL. Rec-1 cells were treated for 72 hours with 1  $\mu$ mol/L lenalidomide and cyclin D1 complexes were analyzed for their content in p27<sup>KIP1</sup> and CDK4. As shown in Fig. 4A, although the drug induced a 16% increase in annexin V-positive apoptotic cells when compared with control condition, it also provoked a substantial decrease of cyclin D1-bound p27<sup>KIP1</sup>. No alteration in CDK4 interaction with cyclin D1 was noticed. This effect did not result from a transcriptional modulation of *CCND1* and *CDKN1B* genes, as no significant modification of their respective transcripts could be observed by quantitative real time-PCR upon lenalidomide treatment (Fig. 4B). More interestingly, the analyses of cyclin D1 and p27<sup>KIP1</sup> subcellular localization by dual immunofluorescence showed that, although both proteins mainly colocalized in the nuclei of Rec-1 cells in control condition, cell exposure to lenalidomide led to a decreased cyclin D1 expression, as well as a reduced p27<sup>KIP1</sup> nuclear amount, leading to a perinuclear cytosolic redistribution of the protein (Fig. 4C, left). Accordingly, lenalidomide-treated cells became positive for the cytosolic, Thr198-phosphorylated form of p27<sup>KIP1</sup> (Fig. 4C). Western blots performed with nuclear and cytosolic extracts from control and lenalidomide-treated Rec-1 cells confirmed this remarkable increase in cytosolic p27<sup>KIP1</sup>-pThr198 levels after lenalidomide treatment (Fig. 4D). Of note, this cytosolic relocation of the CDK inhibitor, together with the induction of caspase-dependent apoptosis, could represent a specific hallmark of the activity of the drug *in vitro*, as illustrated by the screening of proliferation and cell death markers using an antibody array and by the detection of distinct apoptotic features by multispectral imaging flow cytometry (Supplementary Fig. 3A and B). Altogether, these results suggest that, in *in vitro* settings, lenalidomide is able to overcome the nuclear sequestration of p27<sup>KIP1</sup> by cyclin D1, leading to cytosolic relocation of the CDK inhibitor and consequent induction of MCL cell death.

### Antitumoral activity of lenalidomide *in vivo* involves cyclin D1/p27<sup>KIP1</sup> inhibition

In addition to its known direct proapoptotic activity toward MCL cells (21, 22), several studies appointed for an important antiangiogenesis activity of lenalidomide in multiple cancer models (23). As MCL tumors with high



**Figure 3.** Cyclin D1 stabilizes p27<sup>KIP1</sup>. A, Jeko-1 cells were transfected by electroporation with cyclin D1 siRNA and nonsilencing siRNA. Knockdown of cyclin D1 proteins as well as p27<sup>KIP1</sup> expression levels were checked by Western blot.  $\beta$ -Tubulin was probed as a loading control. Ratio between  $\beta$ -tubulin and cyclin D1 and p27<sup>KIP1</sup> levels is shown. B, MCL cells were treated with CHX (50  $\mu$ g/mL) and harvested at the times indicated. Total proteins were purified, separated on SDS-PAGE, revealed by immunoblotting with anti-p27<sup>KIP1</sup>, anti-cyclin D1, and anti- $\beta$ -actin or anti- $\beta$ -tubulin antibodies. The density of each band was measured and p27<sup>KIP1</sup> or cyclin D1 half-life was deduced from the semi-log curve: time/(p27<sup>KIP1</sup>/ $\beta$ -actin ratio) (see supplemental data). C, the calculated half-lives were then plotted on the graph for each cell line.



**Figure 4.** Cyclin D1-mediated stabilization of p27<sup>KIP1</sup> is disrupted by lenalidomide and leads to apoptotic cell death in Rec-1 cells. **A**, protein extracts were prepared from either untreated or lenalidomide-treated (1 μmol/L for 72 hours) Rec-1 cells and immunoprecipitated with anti-cyclin D1 Ab. Proteins were separated by SDS-PAGE and cyclin D1 and p27<sup>KIP1</sup> protein amounts within cyclin D1-bound and -unbound fractions were analyzed as previously. CDK4 was used as quality control of the immunoprecipitation. **B**, RNA was isolated from Rec-1 cells treated with lenalidomide 1 μmol/L for 72 hours. Cyclin D1 and p27<sup>KIP1</sup> mRNA levels were quantified by reverse transcription-PCR and real-time PCR using β-actin as an endogen control. **C**, detection of cyclin D1 (red), total or phosphorylated p27<sup>KIP1</sup> (green), and nuclei (DAPI blue staining) by fluorescence microscopy in Rec-1 cells untreated or treated as above with lenalidomide. **D**, whole cell extracts and cytosol enriched and nucleus enriched extracts from Rec-1 treated as above were analyzed by Western blot for phospho-p27<sup>KIP1</sup>. -, unspecific band. PARP and Grp78 were used as a loading and purity control from nucleus and cytosol, respectively.

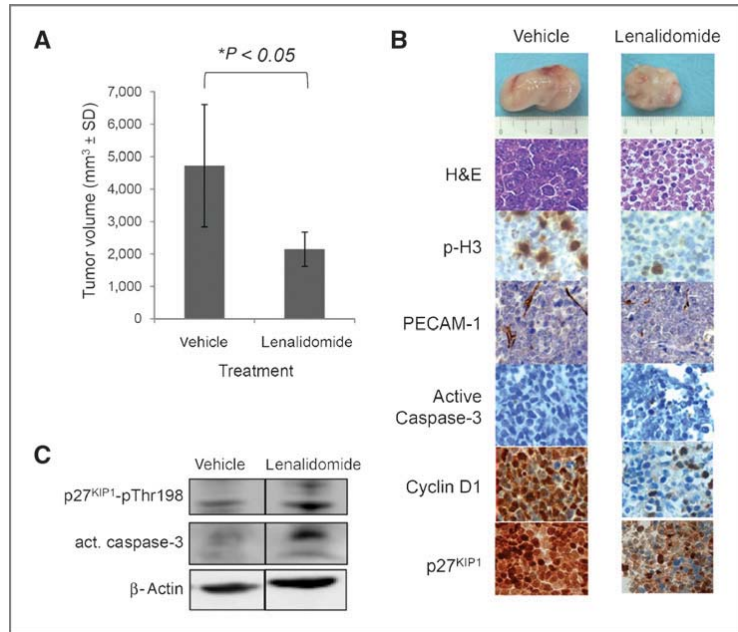
contents of cyclin D1 and p27<sup>KIP1</sup> also presented a high level of vascularization, we next determined whether lenalidomide could target *in vivo* cyclin D1/p27<sup>KIP1</sup> complexes, as well as tumor angiogenesis and progression. CB17-SCID mice were inoculated with JBR cells to generate a cyclin D1<sup>high</sup>-p27<sup>KIP1</sup><sup>high</sup>-MCL xenograft animal model. Within 1 week of inoculation, animals developed palpable tumors that increased rapidly over the next 2 weeks (Fig. 5A). On day 8, when the tumor size reached 5 mm in diameter, mice were randomized into lenalidomide-treated (10 mg/kg) and control (vehicle) groups, receiving the corresponding administration diary, and tumor volume was calculated 23 days postinoculation. As shown in Fig. 5A, lenalidomide therapy achieved a significant MCL tumor regression (\*,  $P < 0.05$ ), when compared with vehicle groups. At this moment, tumor size was reaching about 10% of body weight in control mice, with no evidence of tumor-related toxicity and no differences in mean body weight between vehicle and lenalidomide groups (data not shown). Tumors isolated from control and drug-treated MCL-bearing mice revealed a 40% reduction in tumor burden in the lenalidomide-receiving group (Fig. 5B). As exemplified in Fig. 5B and C, a remarkable decrease in the mitotic index, together with

the activation of caspase-3 and the tightening of blood vessels, was observed in tumors from lenalidomide-receiving mice. Lenalidomide treatment induced a substantial decrease of cyclin D1 and p27<sup>KIP1</sup>, which was associated with the phosphorylation of the CDK inhibitor at threonine 198 (Fig. 5B and C). Taken together, these data confirm the *in vitro* observation that lenalidomide is able to impede the growth of MCL tumors with high cyclin D1 and p27<sup>KIP1</sup> contents, its antitumor effect being related to the cytosolic redistribution p27<sup>KIP1</sup>, and subsequent apoptosis induction.

## Discussion

Current treatment strategies for MCL rely on poly-immunochemotherapy (24) that provides high overall response rates, although the responses are not durable and sequential therapies are thus necessary. In this context, preclinical and clinical studies have proved that MCL is sensitive to a range of novel agents that may become useful adjuvants to standard regimens. Among them, the second-generation immunomodulatory compound lenalidomide has recently demonstrated single-agent efficacy in relapsed and refractory MCL patients (25). Mechanistically, lenalidomide has been

Figure 5. Lenalidomide targets cyclin D1/p27<sup>KIP1</sup> complexes and reduces tumor growth in MCL xenografts. A, JBR cells ( $10^7$  cells per mouse) were subcutaneously inoculated into the right flank of SCID mice. Tumor-bearing animals received intraperitoneal injections of 10 mg/kg lenalidomide or equal volume of vehicle. Lenalidomide has been administered daily for 15 days. B, the corresponding biopsies harbored several hallmarks of lenalidomide activity in JBR cells such as a decrease in mitotic index (p-Histone H3) and angiogenesis (PECAM-1), decrease in cyclin D1 levels, p27<sup>KIP1</sup> cytosolic accumulation, and caspase-3 processing (800 $\times$  magnification). C, Western blot analysis of JBR tumor samples from control and lenalidomide-treated groups, confirming the accumulation of p27<sup>KIP1</sup>-pThr198 and processing of caspase-3 in lenalidomide-exposed MCL tumors.



found in preclinical studies to enhance NK- and T-cell activities against tumor cells, to alter the balance of pro- and anti-inflammatory cytokines, to regulate tumor-stroma interaction, to inhibit angiogenesis, and albeit to a lesser degree, to induce cell-cycle arrest and apoptosis (23). However, it is presently unclear which of these mechanisms are responsible for its clinical activity in responding MCL patients. In this study, we show that lenalidomide antitumor activity in *in vitro* and *in vivo* preclinical models of MCL involves both a tumoricidal role against malignant B cells and an antiangiogenic activity in MCL cultures and xenografts in agreement with previous results obtained in MCL and multiple myeloma models (21, 22, 26).

Of special interest, we demonstrate herein that the drug is able to target the interaction between cyclin D1 and its inhibitor p27<sup>KIP1</sup>. According to our results, this interaction may physiologically underlie the parallelism between p27<sup>KIP1</sup> and cyclin D1 levels, as well as in the elevated levels of both proteins in aggressive MCL subtypes. We report here that p27<sup>KIP1</sup> is detected in all MCL samples with significantly higher levels in blastoid MCL. Moreover, the levels of the protein correlated with cyclin D1 in all MCL tumors and cell lines analyzed. Conversely, previous studies have reported an overall inverse correlation between these 2 proteins in most neoplastic models and a low frequency of p27<sup>KIP1</sup> expression in MCL (5–7). In these studies, the methods used for p27<sup>KIP1</sup> detection did not distinguish tumor cells from residual normal cells and their sensitivity was remarkably weak. The presence of the CDK inhibitor in

all our primary cases and its correlation with cyclin D1 expression were confirmed by a more selective and sensitive cytofluorimetric approach in tumor cell-enriched primary samples.

Our data reveal that increased mitotic index in MCL cell lines is associated with increased tumorigenic potential *in vivo*. This also suggests that, although p27<sup>KIP1</sup> alone is not recognized as a proliferation marker in gene expression studies, elevated contents of both cyclin D1 and p27<sup>KIP1</sup> may be used as a surrogate for the identification of aggressive MCL tumors (27–29).

Although p27<sup>KIP1</sup> is an unstable protein, which is rapidly degraded after its dissociation from cyclin D1/CDK complexes by the proteasome pathway (19), we and others (8) have demonstrated by co-immunoprecipitation experiments that p27<sup>KIP1</sup> and cyclin D1 are bound in MCL cell lines in basal conditions, independently of their expression levels. The calculated half-life of cyclin D1 and p27<sup>KIP1</sup> in all MCL cell lines showed that they were similar among the cell lines analyzed, although cyclin D1 half-life was always shorter than p27<sup>KIP1</sup> half-life. By means of a validated model of transduction of TAT-cyclin D1 fusion protein (30), we found that the presence *de novo* of cyclin D1 in mature B-cell was accompanied by the upregulation of p27<sup>KIP1</sup> and that the degradation of p27<sup>KIP1</sup> followed that of cyclin D1. Finally, we noticed that p27<sup>KIP1</sup> half-life was shortened in the cells in which cyclin D1 was transiently downregulated. Altogether, these data strongly suggest that, in MCL cells, p27<sup>KIP1</sup> degradation could not occur as long as

it is sequestered by cyclin D1. Our results further explains, at least in part, the coexistence of both proteins at high levels in aggressive MCL, associated with elevated mitotic index, high tumorigenicity *in vivo*, and with reported drug resistance. As we show here, lenalidomide is effective in these aggressive cases and high cyclin D1 and p27<sup>KIP1</sup> expression may become a useful surrogate to determine the sensitivity in the clinical settings, although more studies are required. In this context, a recent phase I/II trial revealed a very nice overall response rate (62%) to lenalidomide-based combination in MCL patients with failure to initial treatment (31).

In contrast to solid tumors, where nuclear cyclin D1 overexpression induces the relocalization of p27<sup>KIP1</sup> in the cytoplasmic compartment and increases the proliferation of the malignant cells (17, 18), our data indicate that both proteins colocalize in the nucleus of MCL cells with high cyclin D1 nuclear contents. We have shown a relationship between high cyclin D1/p27<sup>KIP1</sup> levels and high proliferation index and/or aggressive MCL variants, suggesting a possible role of nuclear p27<sup>KIP1</sup> in tumorigenesis *in vivo*. In this sense, the presence of, cyclin D1/p27<sup>KIP1</sup> complexes in aggressive B-cell lymphomas was shown to result not only in an abnormal nuclear accumulation of the CDK inhibitor, but also in a loss of its inhibitory activity toward cyclin E/CDK2 complexes (32). Our results suggest that the disruption of p27<sup>KIP1</sup>/cyclin D1 complexes by lenalidomide, mainly at the nuclear level, may lead to the cytosolic accumulation of a phosphorylated, catalytically inactive form of the CKI (33). Cytoplasmic p27<sup>KIP1</sup> has multiple roles and is involved in several cell functions, including cell motility by inhibiting the RhoA pathway and preventing stress actin fiber polymerization (17, 34). Recently, cytosolic p27<sup>KIP1</sup> has been involved in the control of microtubule stability (35), providing a biological rationale to evaluate new lenalidomide-based combination strategies with microtubule-destabilizing agents. However, further studies are required to completely unravel the functions of nuclear and cytosolic p27<sup>KIP1</sup> in MCL pathogenesis and its possible role in the tumoricidal activity of lenalidomide in this model.

## References

- Jares P, Colomer D, Campo E. Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma. *J Clin Invest* 2012;122:3416–23.
- Perez-Galan P, Dreyling M, Wiestner A. Mantle cell lymphoma: biology, pathogenesis, and the molecular basis of treatment in the genomic era. *Blood* 2011;117:26–38.
- Leonard JP, LaCasce AS, Smith MR, Noy A, Chirieac LR, Rodig SJ, et al. Selective CDK4/6 inhibition with tumor responses by PD0332991 in patients with mantle cell lymphoma. *Blood* 2012;119:4597–607.
- Roue G, Pichereau V, Lincet H, Colomer D, Sola B. Cyclin D1 mediates resistance to apoptosis through upregulation of molecular chaperones and consequent redistribution of cell death regulators. *Oncogene* 2008;27:4909–20.
- Chiarle R, Budel LM, Skolnik J, Frizzera G, Chilosi M, Corato A, et al. Increased proteasome degradation of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 is associated with a decreased overall survival in mantle cell lymphoma. *Blood* 2000;95:619–26.
- Letestu R, Ugo V, Valensi F, Radford-Weiss I, Nataf J, Levy V, et al. Prognostic impact of p27KIP1 expression in cyclin D1 positive lymphoproliferative disorders. *Leukemia* 2004;18:953–61.
- Quintanilla-Martinez L, Thieblemont C, Fend F, Kumar S, Pinyol M, Campo E, et al. Mantle cell lymphomas lack expression of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor. *Am J Pathol* 1998; 153:175–82.
- Quintanilla-Martinez L, vies-Hill T, Fend F, Calzada-Wack J, Sorbara L, Campo E, et al. Sequestration of p27Kip1 protein by cyclin D1 in typical and blastic variants of mantle cell lymphoma (MCL): implications for pathogenesis. *Blood* 2003;101:3181–7.
- Gandhi AK, Kang J, Capone L, Parton A, Wu L, Zhang LH, et al. Dexamethasone synergizes with lenalidomide to inhibit multiple myeloma tumor growth, but reduces lenalidomide-induced immunomodulation of T and NK cell function. *Curr Cancer Drug Targets* 2010; 10:155–67.

## Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

## Authors' Contributions

**Conception and design:** Alexandra Moros, Sophie Bustany, Ifigenia Saborit-Villarroya, Antonio MartÚnez, Brigitte Sola, Gael Roue

**Development of methodology:** Alexandra Moros, Sophie Bustany, Ifigenia Saborit-Villarroya, Antonio MartÚnez, Gael Roue

**Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.):** Alexandra Moros, Sophie Bustany, Gael Roue

**Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis):** Alexandra Moros, Sophie Bustany, Antonio MartÚnez, Brigitte Sola, Gael Roue

**Writing, review, and/or revision of the manuscript:** Alexandra Moros, Sophie Bustany, Julie Cahu, Brigitte Sola, Gael Roue

**Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases):** Alexandra Moros

**Study supervision:** Alexandra Moros, Antonio MartÚnez, Dolores Colomer, Brigitte Sola, Gael Roue

## Acknowledgments

The authors thank A. Barbaras, J. Roldán, L. Jiménez, S. Cabezas, and E. Fernandez for expert technical assistance, Xavier Troussard (Laboratoire d'Hématologie, CHU de Caen, France) and the Tumorothèque de Basse-Normandie for the gift of some MCL samples. We are in debt of V. Rodríguez for her help in *in vivo* studies and P. Pérez-Galán for critically reading the manuscript. Lenalidomide was kindly provided by Celgene. This work was carried out, in part, at the Esther Koplowitz Center, Barcelona.

## Grant Support

This work is supported by Fondo de Investigación Sanitaria (PI09/0060 and PI12/01847; to G. Roue), Ligue contre le Cancer – Comité du Calvados (to B. Sola), Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF 09/9503 and SAF 12/31242; to D. Colomer), Redes Temáticas de Investigación Cooperativa de Cáncer from the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII; RD2006/20/014 and RD12/0036/0004) and Generalitat de Catalunya 2009SGR967 (to D. Colomer). European Regional Development Fund (ERDF) "Una manera de hacer Europa." A. Moros was recipient of a predoctoral fellowship from IDIBAPS. A. MartÚnez is supported by Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigación Sanitaria and FEDER PI11/00907. S. Bustany and J. Cahu were supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR) and by the Conseil Régional de Basse-Normandie (CRBN), respectively.

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 June 7, 2013; revised September 25, 2013; accepted October 11, 2013; published OnlineFirst October 31, 2013.



10. Dawar R, Hernandez-Illizturri F. The emerging role of lenalidomide in the management of mantle cell lymphoma (MCL). *Best Pract Res Clin Haematol* 2012;25:185–90.
11. Vallet S, Witzens-Harig M, Jaeger D, Podar K. Update on immunomodulatory drugs (IMiDs) in hematologic and solid malignancies. *Expert Opin Pharmacother* 2012;13:473–94.
12. Bustany S, Tchakarska G, Sola B. Cyclin D1 regulates p27(Kip1) stability in B cells. *Cell Signal* 2011;23:171–9.
13. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein S, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (4th ed.). Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2008.
14. Roue G, Perez-Galan P, Mozos A, Lopez-Guerra M, Xargay-Torrent S, Rosich L, et al. The Hsp90 inhibitor IPI-504 overcomes bortezomib resistance in mantle cell lymphoma *in vitro* and *in vivo* by down-regulation of the prosurvival ER chaperone BiP/Grp78. *Blood* 2011; 117:1270–9.
15. Rosich L, Xargay-Torrent S, Lopez-Guerra M, Campo E, Colomer D, Roue G. Counteracting autophagy overcomes resistance to everolimus in mantle cell lymphoma. *Clin Cancer Res* 2012;18:5278–89.
16. Yasui M, Yamamoto H, Ngan CY, Damdinsuren B, Sugita Y, Fukunaga H, et al. Antisense to cyclin D1 inhibits vascular endothelial growth factor-stimulated growth of vascular endothelial cells: implication of tumor vascularization. *Clin Cancer Res* 2006;12:4720–9.
17. Larrea MD, Wander SA, Slingerland JM. p27 as Jekyll and Hyde: regulation of cell cycle and cell motility. *Cell Cycle* 2009;8:3455–61.
18. Motti ML, De MC, Califano D, Fusco A, Viglietto G. Akt-dependent T198 phosphorylation of cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1 in breast cancer. *Cell Cycle* 2004;3:1074–80.
19. Kotoshiba S, Kamura T, Hara T, Ishida N, Nakayama KI. Molecular dissection of the interaction between p27 and Kip1 ubiquitylation-promoting complex, the ubiquitin ligase that regulates proteolysis of p27 in G1 phase. *J Biol Chem* 2005;280:17694–700.
20. Bjorklund CC, Ma W, Wang ZQ, Davis RE, Kuhn DJ, Kornblau SM, et al. Evidence of a role for activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in the resistance of plasma cells to lenalidomide. *J Biol Chem* 2011;286: 11009–20.
21. Qian Z, Zhang L, Cai Z, Sun L, Wang H, Yi Q, et al. Lenalidomide synergizes with dexamethasone to induce growth arrest and apoptosis of mantle cell lymphoma cells *in vitro* and *in vivo*. *Leuk Res* 2011; 35:380–6.
22. Zhang L, Qian Z, Cai Z, Sun L, Wang H, Bartlett JB, et al. Synergistic antitumor effects of lenalidomide and rituximab on mantle cell lymphoma *in vitro* and *in vivo*. *Am J Hematol* 2009;84:553–9.
23. Tajeja N. Lenalidomide—current understanding of mechanistic properties. *Anticancer Agents Med Chem* 2011;11:315–26.
24. Brett LK, Williams ME. Current and emerging therapies in mantle cell lymphoma. *Curr Treat Options Oncol* 2013;14:198–211.
25. Eve HE, Carey S, Richardson SJ, Heise CC, Mamidipudi V, Shi T, et al. Single-agent lenalidomide in relapsed/refractory mantle cell lymphoma: results from a UK phase II study suggest activity and possible gender differences. *Br J Haematol* 2012;159: 154–63.
26. Hideshima T, Anderson KC. Novel therapies in MM: from the aspect of preclinical studies. *Int J Hematol* 2011;94:344–54.
27. Hartmann E, Fernandez V, Stoecklein H, Hernandez L, Campo E, Rosenwald A. Increased MDM2 expression is associated with inferior survival in mantle-cell lymphoma, but not related to the MDM2 SNP309. *Haematologica* 2007;92:574–5.
28. Jardin F, Picquenot JM, Parmentier F, Ruminy P, Cornic M, Penther D, et al. Detection of gene copy number aberrations in mantle cell lymphoma by a single quantitative multiplex PCR assay: clinicopathological relevance and prognosis value. *Br J Haematol* 2009;146: 607–18.
29. Rosenwald A, Wright G, Wiestner A, Chan WC, Connors JM, Campo E, et al. The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma. *Cancer Cell* 2003;3:185–97.
30. Tchakarska G, Roussel M, Troussard X, Sola B. Cyclin D1 inhibits mitochondrial activity in B cells. *Cancer Res* 2011;71:1690–9.
31. Wang M, Fayad L, Wagner-Bartak N, Zhang L, Hagemester F, Neelapu SS, et al. Lenalidomide in combination with rituximab for patients with relapsed or refractory mantle-cell lymphoma: a phase 1/2 clinical trial. *Lancet Oncol* 2012;13:716–23.
32. Sanchez-Beato M, Camacho FI, Martinez-Montero JC, Saez AI, Villuendas R, Sanchez-Verde L, et al. Anomalous high p27/KIP1 expression in a subset of aggressive B-cell lymphomas is associated with cyclin D3 overexpression. p27/KIP1-cyclin D3 colocalization in tumor cells. *Blood* 1999;94:765–72.
33. Chu IM, Hengst L, Slingerland JM. The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2008;8:253–67.
34. Besson A, Dowdy SF, Roberts JM. CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev Cell* 2008;14:159–69.
35. Belletti B, Pellizzari I, Berton S, Fabris L, Wolf K, Lovat F, et al. p27kip1 controls cell morphology and motility by regulating microtubule-dependent lipid raft recycling. *Mol Cell Biol* 2010;30: 2229–40.

## **SUPPLEMENTAL MATERIALS AND METHODS**

### **Transduction of TAT-cyclin D1 fusion protein in Ramos cells**

The complete procedure has been detailed elsewhere (29). Briefly, cyclin D1 cDNA was cloned into pTAT-HA plasmid and the resulting plasmid was used to transform BL21(DE3)pLysS thermocompetent *E. coli*. In bacteria, protein production was stimulated by incubation for 3 h with 100  $\mu\text{mol/L}$  isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). TAT-cyclin D1 fusion protein was further purified from bacterial extract and quantified. The Ramos human Burkitt lymphoma cell line (ATCC: CRL-1596) was cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10 % FBS and 1 % penicillin/streptomycin (Lonza), at 37 °C, in a humidified atmosphere. For TAT-fusion protein transduction, Ramos cells were used to seed plates at a density of  $2 \times 10^5$  cells/mL and TAT-cyclin D1 protein was directly added in the culture medium at a final concentration of 250 nmol/L. Cyclin D1 and p27<sup>KIP1</sup> levels were then analyzed by SDS-PAGE at 3, 6 and 24 hours as previously.

### **Human apoptosis antibody array**

Cytosol-enriched protein extracts from Rec-1 cells either untreated or cultured for 72 h with 1  $\mu\text{mol/L}$  lenalidomide were subjected to a Human apoptosis array kit according to supplier's indications (R&D Systems). Briefly, membranes coated with commercial antibodies against 36 distinct proliferation and cell death-related factors, were incubated overnight with 500  $\mu\text{g}$  of protein extracts, followed by incubation with a cocktail of biotinylated detection antibodies. Streptavidin-HRP was added and detected by chemiluminescence (ECL, Amersham) on a mini-LAS4000 device (Fujifilm). The intensity of each membrane spot was then quantified using Image Gauge software

(Fujifilm) and ratio values between treated vs. control cells were represented on the graph.

### **Apoptosis determination by imaging flow cytometry**

Rec-1 cells were either untreated or exposed for 72 h to 1  $\mu\text{mol/L}$  lenalidomide and labeled for DNA content, caspase-3/-7 activity and phosphatidylserine exposure by means of DyeCycle Vybrant Violet, Caspase-3/-7 Cell Event Green (Life Technologies) and annexin V-allophycocyanin (APC) (BenderMedsystems), respectively, before analysis of 2 000 events per condition on an ImageStream multispectral imaging system (Amnis).

## SUPPLEMENTAL FIGURE LEGENDS

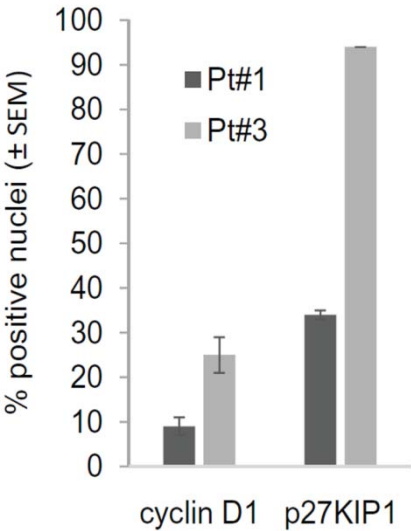
**Fig. S1.** Recounting of cells with nuclear positivity for cyclin D1 and p27<sup>KIP1</sup> in (A) tumor specimen from two MCL patients presenting with a classical (Pt#1) or a blastoid (Pt#3) subtype and (B) in 6 MCL cell lines from either high (Rec-1, JBR and ZBR) or low (JVM-2, Jeko-1 and ZBR) expression profile. The mean of positive nuclei  $\pm$  SEM recounted in representative fields containing an average of 200 MCL cells for each case is presented.

**Fig. S2.** (A) Flow cytometry analysis of cyclin D1 and p27<sup>KIP1</sup> intracellular levels in a set of primary MCL samples (n=10, Table 1). In gray, isotopic control curves; in black, cyclin D1 and p27<sup>KIP1</sup> curves. r indicates x-mean cyclin D1 or p27<sup>KIP1</sup>-Alexa-Fluor 647/x-mean control ratio. (B) Semi-log curves time/f(p27<sup>KIP1</sup> or cyclin D1/ $\beta$ -actin or  $\beta$ -tubulin) ratio deduced from densitometric analysis of cyclin D1 and p27<sup>KIP1</sup> protein levels by Western blot in 4 MCL cell lines. (C) Time-dependent variation in cyclin D1 and p27<sup>KIP1</sup> protein levels by SDS-PAGE in Ramos cells exposed for 3, 6 and 24 h to TAT-cyclin D1 fusion protein.  $\beta$ -tubulin was used as loading control.

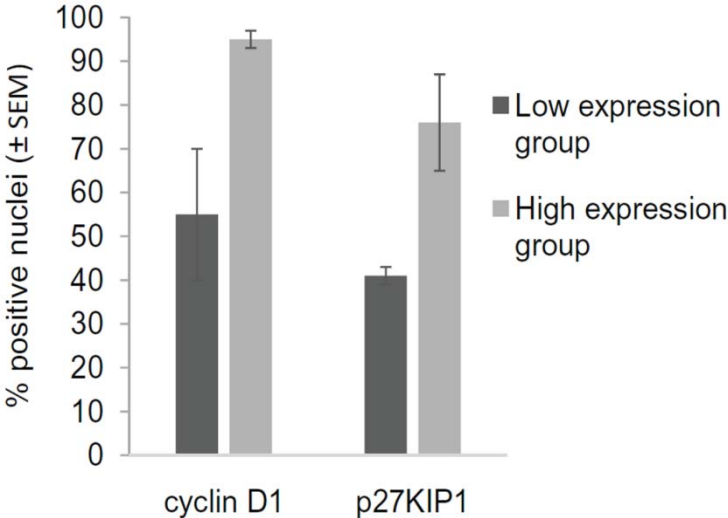
**Fig. S3.** (A) Accumulation of p27<sup>KIP1</sup> and activated caspase-3 in cytosol-enriched protein extracts from Rec-1 cells cultured for 72 h with 1  $\mu$ mol/L lenalidomide and subjected to a Human apoptosis antibody array (R&D Systems). Values were referred to untreated Rec-1 cells. (B) Photomicrographs of representative cell imagery from control and lenalidomide-treated Rec-1 cells labeled for DNA content (violet), caspase-3/-7 activity (green) and phosphatidylserine exposure (red). BF means bright-field. Lenalidomide-treated cells underwent apoptosis, as shown by cell shrinkage, caspase activity, annexin V positivity and nuclear fragmentation.

# Supplemental Figure S1

**A**

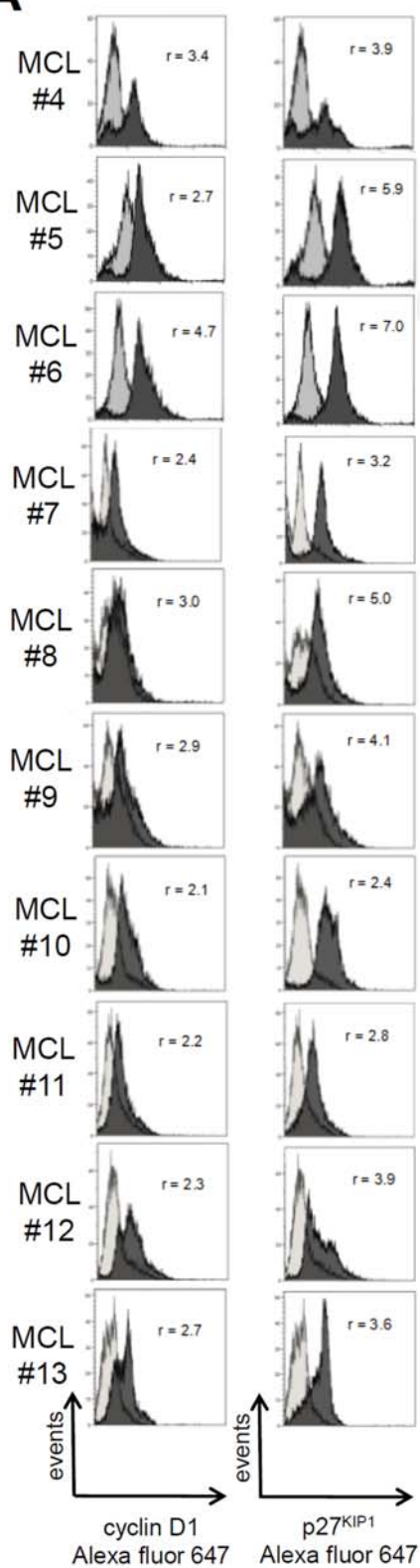


**B**

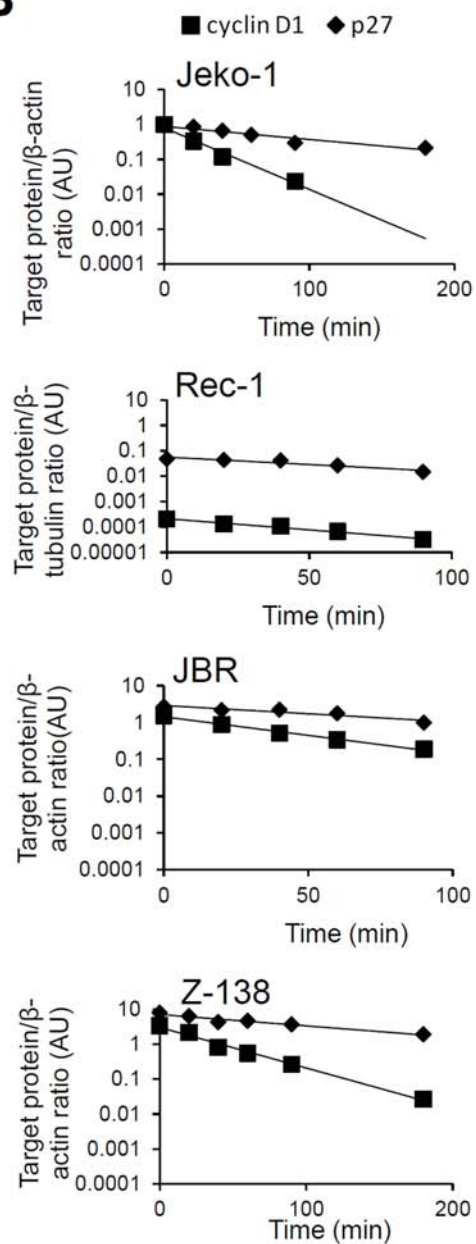


# Supplemental Figure S2

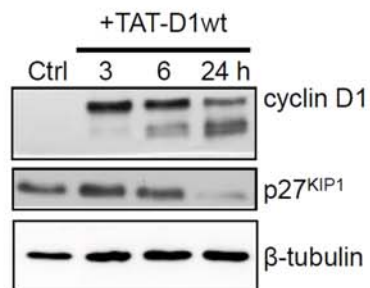
## A



## B

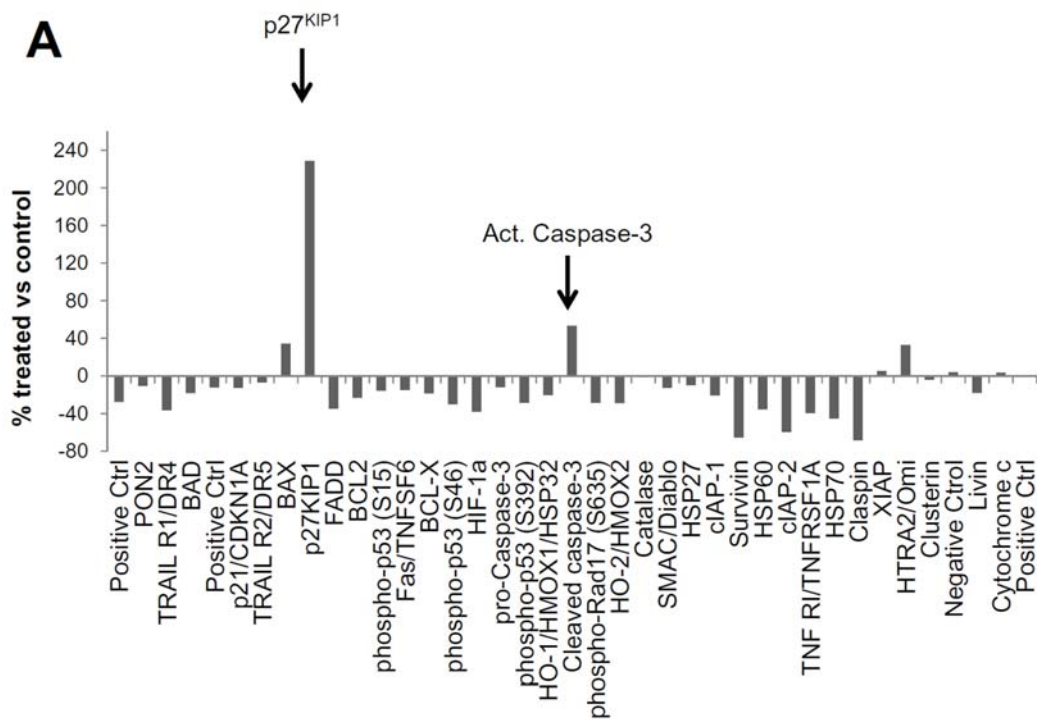


## C

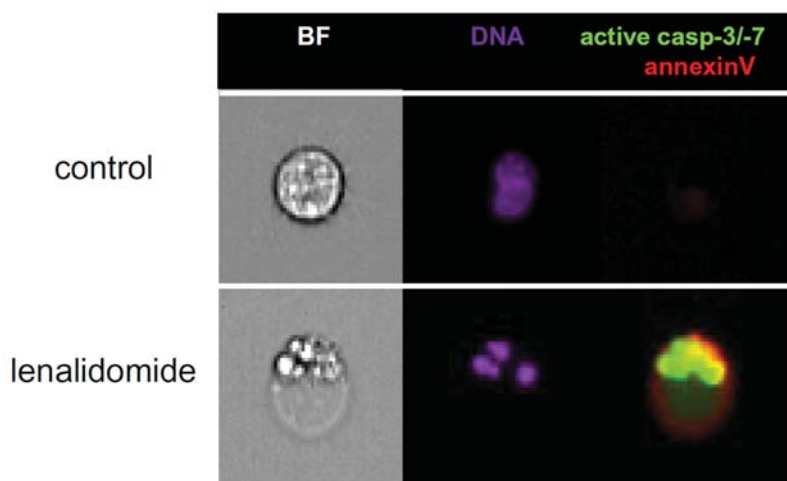


# Supplemental Figure S3

**A**



**B**



**Segon treball**

*Bustany S<sup>1</sup>, Cahu J<sup>1</sup>, Moros A<sup>2</sup>, Troussard X<sup>3</sup>, Gaël R<sup>2</sup>, Sola B<sup>1</sup>.*

Expression and subcellular localization of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 does not correlate with proliferation pattern of mantle lymphoma cells.

**Leuk Lymphoma.** 2014 Sep;55(9):2204-6. doi:  
10.3109/10428194.2013.871633.

*1 Normandie University, UNICAEN, MILPAT (EA 4652), Caen, France*

*2 Hemato-oncology Department, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi I Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain*

*3 CHU de Caen, Laboratoire d'Hématologie, Caen, France*





L'expressió i la localització subcel·lular de l'inhibidor de la cinasa dependent de ciclina p27 no es correlacionen amb el patró de proliferació de les cèl·lules del limfoma del mantell.

El limfoma de cèl·lules del mantell és una malaltia limfoproliferativa caracteritzada per limfòcits tipus B que porten la translocació t(11;14)(q13;q32). Aquesta translocació porta a la sobreexpressió de la ciclina D1. A més de les funcions en el cicle cel·lular, la ciclina D1 té altres activitats depenent de les proteïnes amb qui interacciona, de la seva localització subcel·lular i de la natura de les cèl·lules.

En línies cel·lulars i mostres primàries de MCL, la ciclina D1 s'uneix a l'inhibidor de cinases dependents de ciclines p27<sup>KIP1</sup>, de manera que impedeix la seva degradació. En el MCL, elevats nivells del complex ciclina D1/p27<sup>KIP1</sup> en el nucli s'associen amb un elevat índex mitòtic i més potencial tumorigènic. Això fa pensar que en el MCL, p27<sup>KIP1</sup> no controla el cicle cel·lular i la proliferació.

Es va analitzar la localització subcel·lular de p27<sup>KIP1</sup> a sis línies cel·lulars de MCL en assajos *in vitro*, detectant diferents quantitats de proteïna tant en el nucli com en el citoplasma (excepte en MINO). També es va calcular el temps de duplicació de les cèl·lules i no es va trobar correlació entre els nivells nuclears de p27<sup>KIP1</sup> i la proliferació cel·lular. Com que p27<sup>KIP1</sup> és expressat durant la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> del cicle cel·lular, on regula la transició G<sub>1</sub>/S, es va analitzar el cicle cel·lular per citometria en diferents línies cel·lulars. El percentatge de cèl·lules en fase S va ser similar en tots els casos (excepte en REC-1). En comparar la quantitat de proteïna nuclear de p27<sup>KIP1</sup> i el percentatge de cèl·lules en fase S, no es va veure correlació. Resultats similars es van trobar en comparar el rati p27<sup>KIP1</sup>/ciclina D1 amb el percentatge de

cèl·lules en fase S, el que suggereix que p27<sup>KIP1</sup> i ciclina D1/p27<sup>KIP1</sup> potser no estan regulant la proliferació en el MCL.

També va ser analitzat el paper de p27<sup>KIP1</sup> a mostres primàries *in vitro*. Tal com es va veure en les línies cel·lulars, tampoc no es va trobar correlació entre l'expressió de p27<sup>KIP1</sup> o el rati p27<sup>KIP1</sup>/ciclina D1 i el percentatge de cèl·lules en fase S.

Aquests resultats suggereixen que ni p27<sup>KIP1</sup> ni el complex que forma amb ciclina D1 estan implicats en la regulació de la proliferació en el MCL, recolzant la idea que p27<sup>KIP1</sup> no seria reconegut com a un marcador de proliferació en aquesta entitat.

LETTER TO THE EDITOR

## Expression and subcellular localization of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 does not correlate with proliferation pattern of mantle lymphoma cells

Sophie Bustany<sup>1</sup>, Julie Cahu<sup>1</sup>, Alexandra Moros<sup>2</sup>, Xavier Troussard<sup>3</sup>, Roué Gaël<sup>2</sup> & Brigitte Sola<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Normandie University, UNICAEN, MILPAT (EA 4652), Caen, France, <sup>2</sup>Hemato-oncology Department, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain and <sup>3</sup>CHU de Caen, Laboratoire d'Hématologie, Caen, France

Mantle cell lymphoma (MCL) is a rare chronic lymphoproliferative disorder characterized by the proliferation of mature B lymphocytes carrying the t(11;14)(q13;q32) translocation. The translocation leads to the activation of *CCND1* and in turn, the overexpression of cyclin D1 [1]. *CCND1* gene is one of the most frequently amplified or activated genes in human cancers. Next to its cell cycle regulatory properties, cyclin D1 possesses a large repertoire of cellular functions depending on its partners, its subcellular localization and/or the nature of expressing cells [2]. We reported recently that, in MCL cell lines and primary samples, cyclin D1 binds the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 (or KIP1), thus impairing its degradation, allowing its accumulation both in the nucleus and in the cytoplasm [3]. Cell cycle inhibition is a nuclear p27 function [4,5]. In turn, reduced nuclear and/or mislocalized cytoplasmic p27 is oncogenic and associated with poor patient outcome in various malignancies [6,7]. In sharp contrast, in MCL cells, an elevated level of nuclear cyclin D1/p27 dimers is associated with high mitotic index and tumorigenic potential [3]. This raises the possibility that the cell cycle and proliferation are no longer controlled by p27 itself in MCL.

To investigate this hypothesis, we analyzed the subcellular localization of p27 in a panel of six MCL cell lines and detected different amounts of the protein not only in the nucleus but also in the cytoplasm, except for MINO, in which p27 was mainly cytoplasmic [Figure 1(A) and Supplementary Figure 1(A) to be found online at <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/10428194.2013.871633>]. We then calculated the doubling time of MCL cells cultured in exponential growing conditions (Table I), and found no correlation between the level of nuclear p27 and proliferation properties of the analyzed cell lines [Supplementary Figure 1(B) to be found online at

<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/10428194.2013.871633>]. As p27 is expressed during the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase of the cell cycle where it regulates the G<sub>1</sub>/S transition [8], we analyzed the distribution of MCL cells within the cell cycle by fluorescent activated cell sorting (FACS) after propidium iodide (PI) staining. The percentage of cells within the S phase was similar for all cell lines, except REC-1, which displayed an unusual accumulation in G<sub>2</sub>/M [Figure 1(B)], in agreement with the increased mitotic index that characterized this cell line [3]. The correlation between the doubling time and the percentage of cells in S phase was statistically significant [Figure 1(C)], in accordance with the notion that MCL proliferation is essentially controlled at the G<sub>1</sub>/S transition. We then compared the nuclear p27 protein level and the percentage of cells in S phase, and observed no correlation between these two parameters [Figure 1(D)]. Similar results were obtained when comparing the nuclear p27/cyclin D1 ratio and the percentage of cells in S phase [Supplementary Figure 1(C) to be found online at <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/10428194.2013.871633>], thus suggesting that p27 and p27/cyclin D1 may not regulate MCL cell proliferation.

We next investigated the role of p27 in primary cells from seven patients with MCL. The levels of cyclin D1 and p27 as well as the percentage of cells in S phase were analyzed by FACS as previously described [3]. All primary MCL cells expressed cyclin D1 and p27 proteins [Supplementary Figure 1(D) to be found online at <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/10428194.2013.871633>]. Cell cycle analysis of these primary samples showed that the percentage of cells in S phase varied from 2 to 11% [Figure 1(E)]. As observed in the cell lines, we found no correlation between p27 expression or p27/cyclin D1 ratio and the percentage of cells in S phase in MCL primary cultures [Figure 1(F) and Supplementary Figure 1(E)

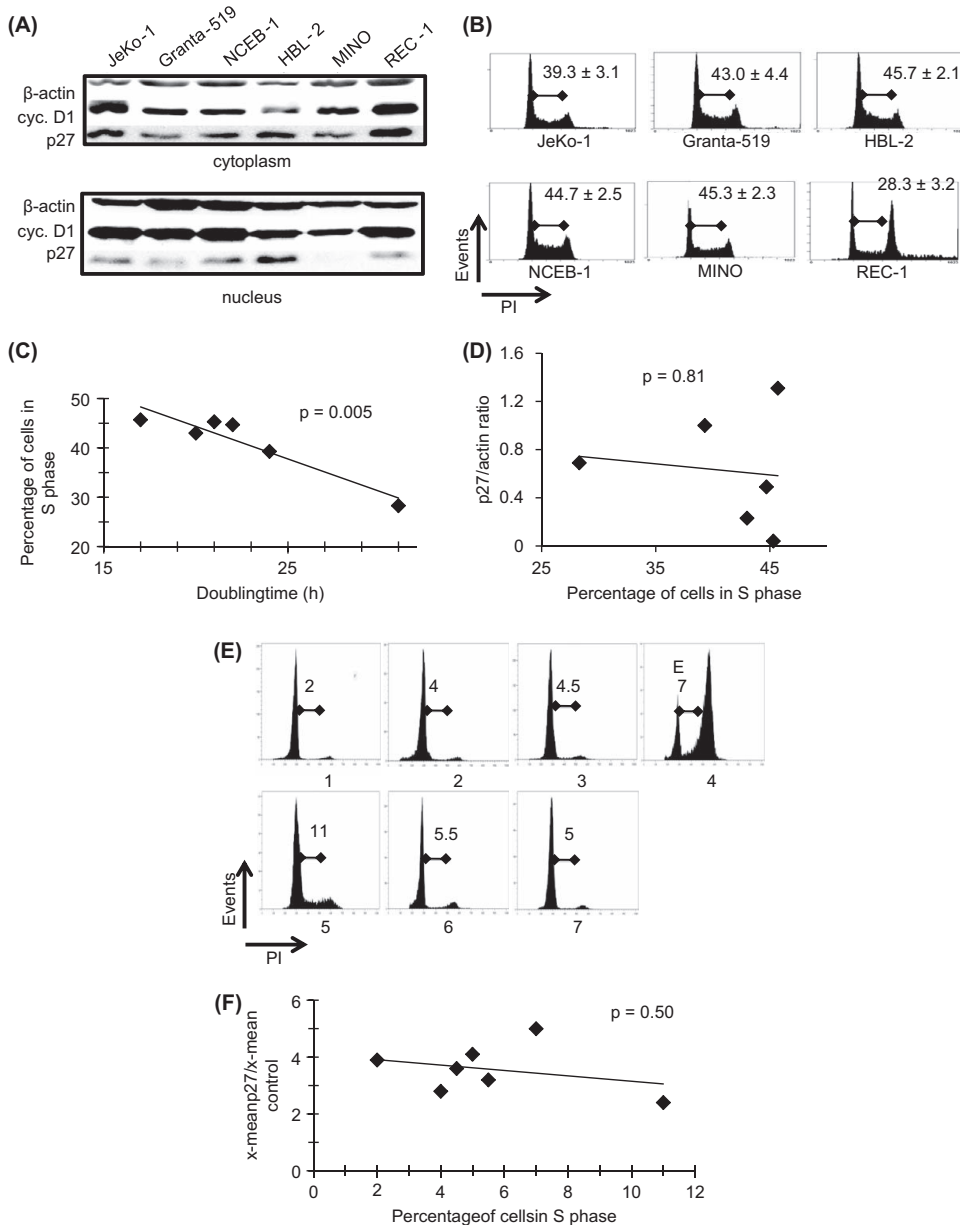


Figure 1. p27 is not a regulator of MCL cell proliferation. (A) Nuclear and cytoplasmic fractions were prepared from cultured MCL cell lines (JeKo-1, Granta-519, NCEB-1, HBL-2, MINO and REC-1) and immunoblotting was performed as described [12]. We used the following antibodies: anti-cyclin D1 (sc-718), -p27 (sc-528), - $\beta$ -actin (sc-47778, as control for charge and transfer), all from Santa Cruz Biotech. (B) Cultured MCL cells were fixed in ethanol 80%, stained with PI and analyzed by FACS. At least 10 000 events were gated for each cell line. Cellular fluorescence was analyzed with a Gallios<sup>®</sup> cytometer and data using Kaluza<sup>®</sup> software (Beckman Coulter). The percentage of cells within S phase calculated from three independent experiments as well as SD is indicated on the graph. (C) For each cell line ( $\blacklozenge$ ), doubling time (in h) was plotted against percentage of cells within S phase. Statistical analysis was performed using Pearson's test. (D) Density of each band obtained by immunoblotting was estimated with a FluorSImager<sup>®</sup> and QuantityOne<sup>®</sup> software (Bio-Rad). Various p27/actin ratios were calculated and then plotted against percentage of cells in S phase. Statistical analysis was performed using Pearson's test. (E) Seven blood or ganglion specimens from patients with MCL (numbers 1-7) were obtained as approved by the Hospital University of Caen and tumor library of Basse-Normandie. All samples were collected at diagnosis and contained more than 85% CD19+/CD5+ malignant lymphocytes. Primary MCL cells were cultured for 15 h then fixed in 80% ethanol and stained with PI as described previously [3]. At least 10 000 events were analyzed for each patient. Percentage of cells in S phase is indicated on the graph. (F) Primary cells ( $10^6$ ) from patients with MCL were permeabilized with Perm & Stab reagent (Beckman Coulter). Cells were labeled with primary anti-cyclin D1 or -p27 antibodies then with secondary anti-rabbit immunoglobulin G (IgG) Alexa-Fluor 647<sup>®</sup> antibody before being fixed in paraformaldehyde (PFA) solution. Isotypic control was prepared without primary antibody. At least 10 000 events were analyzed for each patient. Ratios x-mean p27 fluorescence/x-mean control were calculated to evaluate protein expression and plotted against percentage of cells in S phase. Statistical analysis was performed using Pearson's test.

Table I. Proliferation status of MCL cell lines\*

	Cell line					
	JeKo-1	Granta-519	NCEB-1	MINO	HBL-2	REC-1
Doubling time (h)	24.3 ± 0.6	20.3 ± 0.9	21.9 ± 0.4	20.6 ± 1.6	16.6 ± 0.3	31.1 ± 0.6

MCL, mantle cell lymphoma.

\*Cell lines were seeded at a density of  $10^5$  cells/mL and cultured for 4 days in RPMI 1640 medium supplemented with fetal calf serum. Doubling time was calculated during the exponential growing period with the formula: doubling time =  $(\text{time } X - \text{time } Y) \times \log 2 / [\log(\text{number of cells at time } X) - \log(\text{number of cells at time } Y)]$ . Three independent cultures were seeded for each cell line and results are expressed as mean ± SD.

to be found online at <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/10428194.2013.871633>.

Altogether, our results strongly suggest that p27 or its complex with cyclin D1 may not be involved in the regulation of MCL cell proliferation, reinforcing previously published data showing that p27 is not recognized as a proliferation marker in gene expression studies [9–11]. Further studies will be required to explore the nuclear function of p27 in MCL pathogenesis.

**Potential conflict of interest:** Disclosure forms provided by the authors are available with the full text of this article at [www.informahealthcare.com/lal](http://www.informahealthcare.com/lal).

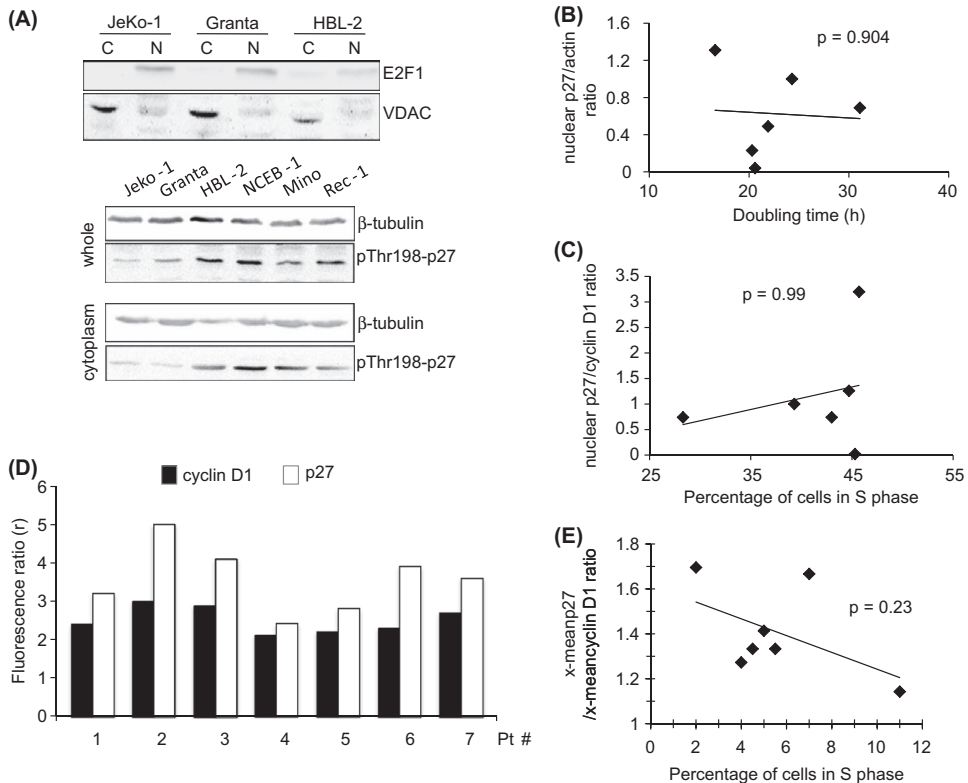
## References

- [1] Jares P, Colomer D, Campo E. Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma. *J Clin Invest* 2012;122:3416–3423.
- [2] Musgrove EA, Caldon CE, Barraclough J, et al. Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nat Rev Cancer* 2011;11:558–572.
- [3] Moros A, Bustany S, Cahu J, et al. Antitumoral activity of lenaleneomide in in vitro and in vivo models of mantle cell lymphoma involves the destabilization of cyclin D1/p27<sup>KIP1</sup> complexes. *Clin Cancer Res* 2013 Nov 6. [Epub ahead of print]
- [4] Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, et al. p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 1994;8:9–22.
- [5] Slingerland JM, Hengst L, Pan CH, et al. A novel inhibitor of cyclin-Cdk activity detected in transforming growth factor beta-arrested epithelial cells. *Mol Cell Biol* 1994;14:3683–3694.
- [6] Besson A, Dowdy SF, Roberts JM. CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev Cell* 2008;14:159–169.
- [7] Wander SA, Zhao D, Slingerland JM. p27: a barometer of signaling deregulation and potential predictor of response to targeted therapies. *Clin Cancer Res* 2011;17:12–18.
- [8] Kotoshiba S, Kamura T, Hara T, et al. Molecular dissection of the interaction between p27 and Kip1 ubiquitylation-promoting complex, the ubiquitin ligase that regulates proteolysis of p27 in G1 phase. *J Biol Chem* 2005;280:17694–17700.
- [9] Rosenwald A, Wright G, Wiestner A, et al. The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma. *Cancer Cell* 2003;3:185–197.
- [10] Hartmann E, Fernandez V, Stoecklein H, et al. Increased MDM2 expression is associated with inferior survival in mantle cell lymphoma, but not related to the MDM2 SNP309. *Haematologica* 2007;92:574–575.
- [11] Jardin F, Picquenot JM, Parmentier F, et al. Detection of gene copy number aberrations in mantle cell lymphoma by a single quantitative multiplex PCR assay: clinicopathological relevance and prognosis value. *Br J Haematol* 2009;146:607–618.
- [12] Bustany S, Tchakarska G, Sola B. Cyclin D1 regulates p27<sup>KIP1</sup> stability in B cells. *Cell Signal* 2011;23:171–179.

## Supplementary material available online

Supplementary Figure 1 showing further results.

Supplementary material for Bustany S, et al. Expression and subcellular localization of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 does not correlate with proliferation pattern of mantle lymphoma cells, *Leuk Lymphoma* 2014;doi: 10.3109/10428194.2013.871633.



Supplementary Figure 1. A. Whole cell, nuclear (N) and cytoplasmic (C) fractions were prepared from cultured MCL cell lines (JeKo-1, Granta-519, NCEB-1, HBL-2, MINO and REC-1) and immunoblotting was performed as described [12]. The purity of nuclear/cytoplasmic extracts was verified using Abs directed against E2F1 (sc-251), a transcriptional factor, VDAC (voltage-dependent anion channel, sc-98708 from Santa Cruz Biotech.), a mitochondrial protein. The phosphorylated form of p27 (phospho-Thr198-p27), which is strictly cytoplasmic, was also analyzed with an Ab from R&D Systems. Gel loading and transfer were verified using an anti- $\beta$ -tubulin Ab (sc-9104, Santa Cruz Biotech.). B. Cell extracts were prepared from cultured MCL cell lines, separated with SDS-PAGE and immunoblotted with anti-p27 or -cyclin D1 and  $\beta$ -actin Abs as illustrated. The Western blots were imaged with a FluorImager<sup>®</sup> and the density of each band evaluated by the QuantityOne<sup>®</sup> software. For each cell line, the nuclear p27/ $\beta$ -actin ratio was plotted against the doubling time determined in Table I. Statistical analysis was performed using Pearson's test. C. Cell extracts were prepared from cultured MCL cell lines, separated with SDS-PAGE and immunoblotted with anti-p27 or -cyclin D1 and  $\beta$ -actin Abs as illustrated. The ratios nuclear p27/nuclear cyclin D1 were calculated as before and then plotted against the percentage of cells in S phase. Statistical analysis was performed using Pearson's test. D. Primary MCL cells (106) from patients #1-7 were permeabilized and labeled as described in the legend of Cellular fluorescence was analyzed with a Gallios<sup>®</sup> cytometer and the Kaluza<sup>®</sup> software. r indicated x-mean cyclin D1-Alexa-Fluor 647<sup>®</sup>/x-mean control ratio (in black) or x-mean p27/x-mean control ratio (in white); r are reported on the histogram. E. From the previous experiments, the ratios: x-mean cyclin D1 and p27 fluorescence/x-mean control were calculated and plotted against the percentage of cells in the S phase. Statistical analysis was performed using Pearson's test.

## **Tercer treball**

*Moros A<sup>1</sup>, Rodríguez V<sup>1</sup>, Saborit-Villarroya I<sup>1</sup>, Montraveta A<sup>1</sup>, Balsas P<sup>1</sup>, Sandy P<sup>2</sup>, Martínez A<sup>3</sup>, Wiestner A<sup>4</sup>, Normant E<sup>2</sup>, Campo E<sup>1,3</sup>, Pérez-Galán P<sup>1</sup>, Colomer D<sup>1,3</sup>, Roué G<sup>1</sup>.*

Synergistic antitumor activity of lenalidomide with the BET bromodomain inhibitor CPI203 in bortezomib-resistant mantle cell lymphoma.

**Leukemia.** 2014 Mar 18. doi: 10.1038/leu.2014.106.

*1 Hemato-oncology Department, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain*

*2 Constellation Pharmaceuticals, Inc, Cambridge, MA, USA*

*3 Hematopathology Unit, Department of Pathology, Hospital Clínic, Barcelona, Spain*

*4 Hematology Branch, National Heart, Lung, and Blood Institute, Bethesda, MD, USA*





Activitat antitumoral sinèrgica de la lenalidomida amb l'inhibidor del bromodomini BET CPI203 en el limfoma de cèl·lules del mantell resistent a bortezomib.

El tractament amb bortezomib ha mostrat una activitat clínica prometedora en el limfoma de cèl·lules del mantell, però el desenvolupament de resistència a la inhibició del proteasoma pot limitar la seva eficàcia. Per aclarir els factors involucrats en l'adquisició de la resistència al bortezomib *in vivo*, ratolins immunodeprimits van ser inoculats amb diferents línies de MCL amb diferent sensibilitat al fàrmac i a continuació es va procedir a determinar el perfil d'expressió gènica dels tumors i a la validació funcional de les signatures gèniques identificades. Vàrem observar una augmentada tumorigenicitat *in vivo* en els casos de MCL resistent a bortezomib, que va ser associada a trets de diferenciació plasmocítica, com un augment en IRF4 i Blimp-1. La lenalidomida va ser particularment efectiva en aquest subgrup de tumors, actuant sobre l'expressió d'IRF4 i el programa de diferenciació plasmocítica, i en conseqüència, superant la resistència a bortezomib. A més, la inhibició del gen diana d'IRF4, MYC en les cèl·lules resistents a bortezomib mitjançant bé *knockdown* o bé tractament amb CPI203, un inhibidor de proteïnes BET, va induir de forma sinèrgica la mort cel·lular quan es va combinar amb la lenalidomida. En ratolins, l'addició de tots dos tractaments, el CPI203 i la lenalidomida, va promoure la reducció de la càrrega tumoral, implicant la disminució simultània de MYC i d'IRF4 i la inducció d'apoptosi. Tot plegat, aquests resultats suggereixen que la senyalització exacerbada d'IRF4/MYC està associada a la resistència a bortezomib en el MCL *in vivo* i garanteix l'avaluació clínica de la lenalidomida conjuntament amb l'inhibidor de proteïnes BET en combinació en casos de MCL refractaris a la inhibició del proteasoma.



ORIGINAL ARTICLE

# Synergistic antitumor activity of lenalidomide with the BET bromodomain inhibitor CPI203 in bortezomib-resistant mantle cell lymphoma

A Moros<sup>1</sup>, V Rodríguez<sup>1</sup>, I Saborit-Villarroya<sup>1</sup>, A Montraveta<sup>1</sup>, P Balsas<sup>1</sup>, P Sandy<sup>2</sup>, A Martínez<sup>3</sup>, A Wiestner<sup>4</sup>, E Normant<sup>2</sup>, E Campo<sup>1,3</sup>, P Pérez-Galán<sup>1</sup>, D Colomer<sup>1,3</sup> and G Roué<sup>1</sup>

Bortezomib therapy has shown promising clinical activity in mantle cell lymphoma (MCL), but the development of resistance to proteasome inhibition may limit its efficacy. To unravel the factors involved in the acquisition of bortezomib resistance *in vivo*, immunodeficient mice were engrafted with a set of MCL cell lines with different levels of sensitivity to the drug, followed by gene expression profiling of the tumors and functional validation of the identified gene signatures. We observed an increased tumorigenicity of bortezomib-resistant MCL cells *in vivo*, which was associated with plasmacytic differentiation features, like interferon regulatory factor 4 (IRF4) and Blimp-1 upregulation. Lenalidomide was particularly active in this subgroup of tumors, targeting IRF4 expression and plasmacytic differentiation program, thus overcoming bortezomib resistance. Moreover, repression of the IRF4 target gene *MYC* in bortezomib-resistant cells by gene knockdown or treatment with CPI203, a BET (bromodomain and extra terminal) bromodomain inhibitor, synergistically induced cell death when combined with lenalidomide. In mice, addition of CPI203 to lenalidomide therapy further decreased tumor burden, involving simultaneous *MYC* and IRF4 downregulation and apoptosis induction. Together, these results suggest that exacerbated IRF4/*MYC* signaling is associated to bortezomib resistance in MCL *in vivo* and warrant clinical evaluation of lenalidomide plus BET inhibitor combination in MCL cases refractory to proteasome inhibition.

*Leukemia* advance online publication, 11 April 2014; doi:10.1038/leu.2014.106

## INTRODUCTION

Mantle cell lymphoma (MCL) is an aggressive B-cell neoplasm characterized by the translocation t(11;14)(q13;q32) that leads to aberrant overexpression of cyclin D1 and a number of secondary chromosomal and molecular alterations affecting the cell cycle, senescence and cellular response to DNA damage.<sup>1</sup> Conventional chemotherapy induces high remission rates in previously untreated patients, but relapses within a few years are common, being the median survival 5–7 years.<sup>2</sup>

The first-in-class proteasome inhibitor bortezomib (VELCADE) is a potent and reversible inhibitor of the 26S proteasome activity, approved in 2006 as second-line treatment for MCL.<sup>3,4</sup> Bortezomib induces response rates of 30% to 50% in patients with relapsed disease, irrespective of their sensitivity to prior therapy.<sup>5–7</sup> However, more than half of all MCL patients are intrinsically resistant or develop resistance to bortezomib.<sup>2</sup> The molecular bases underlying this resistance have not been totally defined in *in vivo* settings, although *in vitro* approaches recently pointed out an important role of oxidative and endoplasmic reticulum stress,<sup>8</sup> closely linked to the activation of the cytoprotective arm of the unfolded protein response.<sup>9</sup> In addition, bortezomib-resistant MCL cell lines and primary tumor samples both harbor features characteristic of partial plasmacytic differentiation, including increased expression and transcriptional activity of interferon regulatory factor 4 (IRF4) and of the plasma-cell surface markers CD38 and CD138.<sup>10</sup> Although a physiological role of IRF4 in MCL

pathogenesis requires further elucidation, this crucial regulator of B-cell differentiation and expansion was originally identified as an oncogene transcriptionally activated by t(6;14)(p25;q32) chromosomal translocation in multiple myeloma (MM), where its expression is associated with a poor prognosis.<sup>11,12</sup> MM cells were further shown to be addicted to an aberrant IRF4 regulatory network, involving an auto-regulatory control mechanism of IRF4 by its target gene *MYC*.<sup>13</sup>

Currently under active investigation for the treatment of B-cell neoplasms, the immunomodulatory drug lenalidomide has recently shown to be well tolerated and to produce rapid and durable responses in heavily pre-treated patients with aggressive, relapsed/refractory MCL, including patients who had failed bortezomib therapy.<sup>14–17</sup> In addition, a promising overall response rate of lenalidomide in combination therapy has been observed in MCL patients with a poor response to initial treatment.<sup>18</sup> Of interest, the direct antitumor activity of lenalidomide has been shown to rely on the inhibition of the IRF4/*MYC* loop, and to depend on the level of expression of the E3 ligase protein cereblon (CRBN) in both MM cells and in the activated B-cell-like subtype of diffuse large B-cell lymphoma (ABC-DLBCL).<sup>19–22</sup>

Our aim was to validate IRF4 overexpression and plasmacytic differentiation as markers of bortezomib resistance in *in vivo* xenotransplantation models of MCL, and to assess the possibility of targeting IRF4/*MYC* signaling and overcoming bortezomib resistance using lenalidomide-based therapies.

<sup>1</sup>Hemato-Oncology Department, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Department of Pharmacology, Constellation Pharmaceuticals, Inc., Cambridge, MA, USA; <sup>3</sup>Hematopathology Unit, Department of Pathology, Hospital Clinic, Barcelona, Spain and <sup>4</sup>Hematology Branch, National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA. Correspondence: Dr G Roué, Hemato-Oncology Department, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Rosselló, 153, Barcelona 08036, Spain.

E-mail: groue@clinic.uib.es

Received 2 January 2014; revised 26 February 2014; accepted 10 March 2014; accepted article preview online 18 March 2014

## MATERIALS AND METHODS

### Cell lines and primary samples

The nine human MCL cell lines (Z-138, ZBR, JeKo-1, JBR, REC-1, JVM-2, GRANTA-519, UPN-1 and Mino) used in this study were cultured, routinely tested for *Mycoplasma* infection and checked for their identity as previously described.<sup>9</sup> Primary MCL cells from four previously untreated patients (see clinical characteristics in Supplementary Table 1), diagnosed according to the World Health Organization (WHO) classification criteria<sup>23</sup> were used. The ethical approvals for this project including the informed consent of the patients were granted following the guidelines of the Hospital Clinic Ethics Committee (Institutional Review Board). Mononuclear cells were isolated from peripheral blood by Ficoll/Hypaque sedimentation (GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK) and stored in the Hematopathology Biobank of our institution (Biobanks from CDB-IDIBAPS-Hospital Clinic).

### Xenograft mouse model and tumor phenotyping

CB17-severe combined immunodeficiency (SCID) mice (Charles River Laboratories, L'Arbresle, France) were inoculated subcutaneously with  $10^7$  cells of the indicated MCL cell line, and monitored for tumor growth and vital parameters as previously described.<sup>9</sup> For lenalidomide (kindly provided by Celgene Corporation, Summit, NJ, USA) and lenalidomide-bortezomib dosing, mice were randomly assigned into cohorts of 3–4 mice each and received by intraperitoneal injection a twice weekly dose of bortezomib (0.15 mg/kg, kindly provided by Millenium/Takeda Oncology, Cambridge, MA, USA), a daily dose of lenalidomide (50 mg/kg), the combination of lenalidomide and bortezomib, or an equal volume of vehicle. In the lenalidomide–CPI203 protocol (CPI203 was kindly provided by Constellation Pharmaceuticals, Cambridge, MA, USA), a total of 22 REC-1 tumor-bearing mice were randomly assigned to cohorts of 5–6 mice, receiving a twice daily intraperitoneal injection of 2.5 mg/kg CPI203, a daily intraperitoneal injection of 50 mg/kg lenalidomide, both agents or an equal volume of vehicle. Between 26 and 29 days post-inoculation, animals were killed according to institutional guidelines and tumor samples were subjected to immunohistochemical staining using primary antibodies against phospho-histone H3 (Epitomics, Burlingame, CA, USA), cleaved caspase-3 (SA1E) and MYC (D84C12) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), IRF4 (M-17) and platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) (M20) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), CD19 (LE-CD19) (Dako, Glostrup, Denmark), Blimp-1 (clone Ros195G/G5, kindly provided by G Roncador, Spanish National Cancer Centre, Madrid, Spain), PAX5 (clone 24, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), CCL3 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and CD38 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), as previously described.<sup>9</sup> Preparations were evaluated using an Olympus DP70 microscope and Cell B Basic Imaging Software (Olympus, Hamburg, Germany).

### Gene expression profiling

Total RNA was extracted from representative tumors derived from JeKo-1 ( $n = 5$ ) and JBR ( $n = 2$ ) cell lines using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Complementary RNA was hybridized on the HT HG-U219 GeneChip (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) following standardized protocols. Scanning was processed in a Gene Titan instrument and analyzed with GeneChip Command Console Software (Affymetrix). Raw data were normalized using the Robust Multichip Analysis algorithm implemented in the Expression Console Software v1.1 (Affymetrix). An enrichment pathway analysis was done using the gene set enrichment analysis desktop application version 2.0 (<http://www.broadinstitute.org/gsea/>) in order to find significant gene signatures using experimentally derived custom gene sets (<http://lymphochip.nih.gov/signaturedb/index.html>).<sup>24</sup> A two-class analysis with 1000 permutations of gene sets and a weighted metric was used. Gene sets with a false discovery rate below 0.05 were considered to be significant. The leading edge of enriched gene sets, the subset of genes that contributed the most to the enrichment result, were displayed using the Cluster v2.11 and TreeView v1.6 programs (Eisen Laboratory University of California at Berkeley, CA, USA). Primary microarray data are available at the Gene Expression Omnibus of the National Center for Biotechnology Information (GSE51371).

### Cytofluorimetric analysis

Phosphatidylserine exposure was quantified by staining with annexin V as described.<sup>25</sup> CD38 expression was determined by staining cells with a phycoerythrin-labeled anti-CD38 antibody, using an immunoglobulin G1 isotype-phycoerythrin as negative control (Becton Dickinson). Ten thousand

stained cells per sample were acquired and analyzed in an Attune acoustic focusing cytometer using Attune software (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

### Western blot assays

Five millions cells were lysed in Triton buffer as previously described<sup>9</sup> and 50  $\mu$ g proteins were transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (Immobilon-P, Millipore, Billerica, MA, USA) and probed with antibodies against MYC or IRF4 and the endogenous  $\beta$ -actin (Sigma-Aldrich), followed by incubation with anti-rabbit (Cell Signaling Technology), anti-goat (Santa Cruz Biotechnology) or anti-mouse (Sigma-Aldrich) secondary antibodies. Chemiluminescence detection was done by using ECL system (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) in a mini-LAS4000 device with Image Gauge software (Fujifilm, Tokyo, Japan).

### RNA isolation and real-time PCR

Total RNA was extracted using TRIzol (Life Technologies) following the manufacturer's instructions. One microgram of RNA was retrotranscribed to complementary DNA using moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Life Technologies) and random hexamer primers (Roche, Basel, Switzerland). mRNA expression was analyzed in duplicate by quantitative real-time PCR on the Step one system by using predesigned Assay-on-Demand primers and probes (Life Technologies). The relative expression of each gene was quantified by the comparative cycle threshold method ( $\Delta\Delta C_t$ ).  $\beta$ -Actin was used as an endogenous control.

### RNA interference assay

REC-1 cells ( $7 \times 10^5$ ) were electroporated with a Nucleofector Device (Lonza, Verviers, Belgium, program A-032) Ingenio Electroporation Solution (Mirus, Madison, WI, USA) containing either 2.5  $\mu$ M of a Silencer Select Predesigned small interfering RNA (siRNA) targeting the MYC gene, a mix of two Silencer Select Predesigned siRNA targeting the *IRF4* gene or a non-silencing (scramble) siRNA (Ambion, Austin, TX, USA), or 200 nM of a mix of three different predesigned siRNA-targeting *CRBN* gene or a control duplex siRNA (Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgium). After transfection, cells were transferred to culture plates for 6 h before experiments were set up.

### Cell proliferation assay

MCL primary cells ( $1.5 \times 10^5$ ) and cell lines ( $4 \times 10^4$ ) were incubated as indicated with lenalidomide and/or CPI203. MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) reagent (Sigma-Aldrich) was added for 2–6 additional hours before spectrophotometric measurement. Each measurement was made in triplicate. Values were represented using untreated control cells as reference. The  $GI_{50}$  was calculated as the concentration that produced 50% growth inhibition. Combination indexes (CIs) were calculated by using the Calcsyn software version 2.0 (Biosoft, Ferguson, MO, USA). The interaction between two drugs was considered synergistic when  $CI < 1$ .

### Statistical analysis

Data are represented as mean ( $\pm$  s.d. or s.e.m) of three independent experiments. All statistical analyses were done using GraphPad Prism 4.0 software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Comparisons between two groups of samples were evaluated by the Student's *t*-test or nonparametric Mann–Whitney test. Results were considered statistically significant when  $P < 0.05$ .

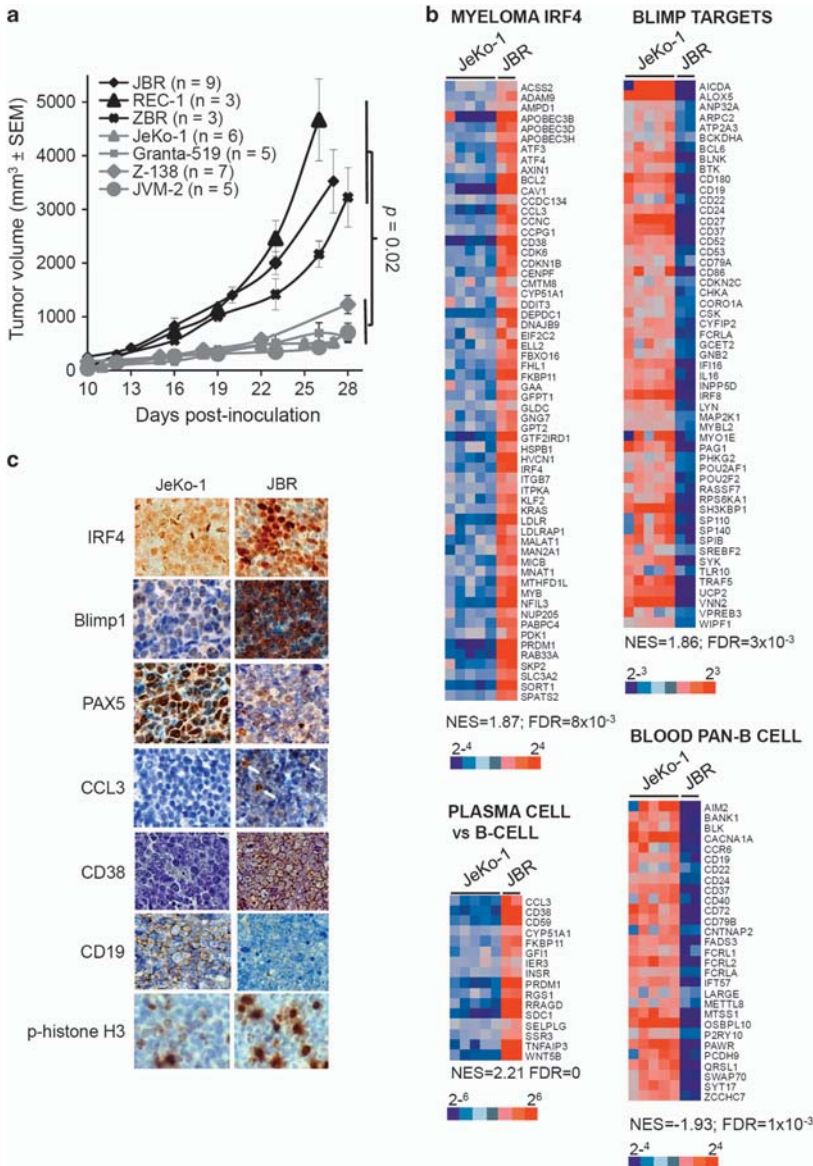
## RESULTS

### Bortezomib resistance correlates with plasmacytic differentiation and increased tumorigenicity *in vivo*

To investigate the impact of bortezomib resistance on MCL cell tumorigenicity, three MCL cell lines with acquired or constitutive resistance to bortezomib (JBR, ZBR and REC-1), as well as four bortezomib-sensitive cell lines (JeKo-1, Z-138, JVM-2 and GRANTA-519) were inoculated in immunodeficient mice to generate the corresponding MCL xenograft models. The generation and characterization of JBR and ZBR, derived from the parental, bortezomib-sensitive cell lines JeKo-1 and Z-138, respectively, have been described previously.<sup>9</sup> Although these cell lines did not

show noticeable differences in their growth properties *in vitro* (data not shown), a significant increase in tumor burden was observed 4 weeks after the inoculation in animals engrafted with the bortezomib-resistant cell lines compared with the mice bearing bortezomib-sensitive tumors (Figure 1a). To investigate

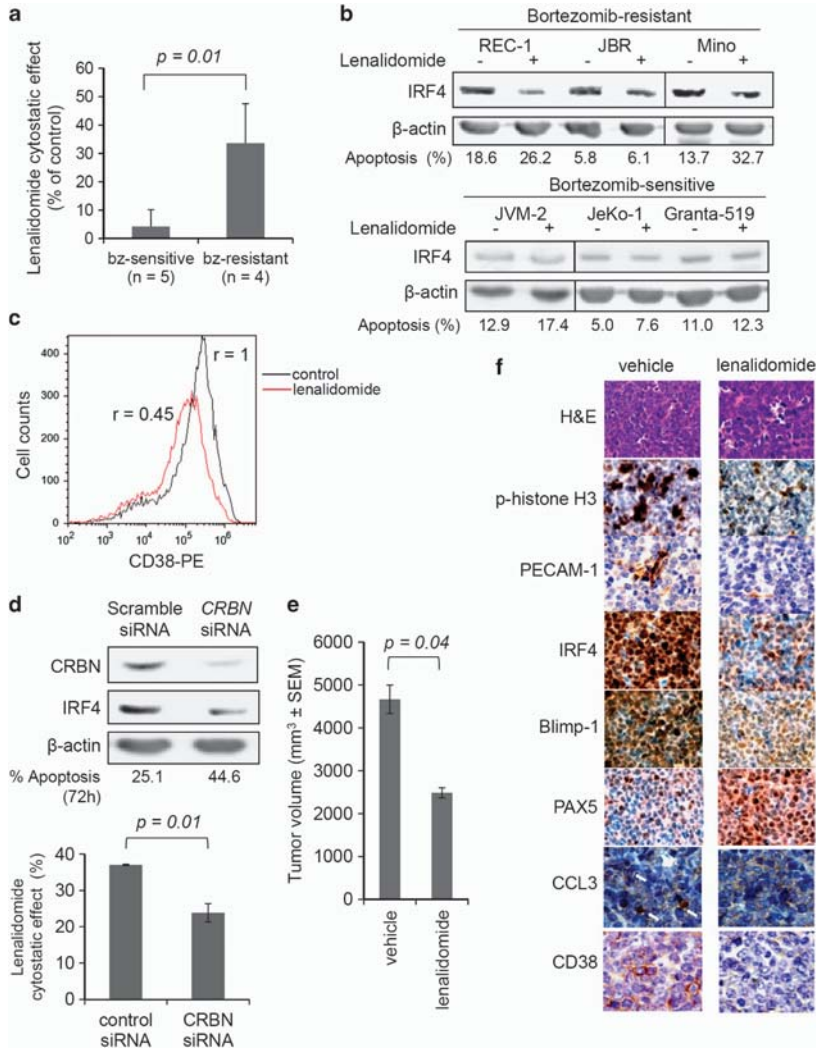
the molecular basis of this phenomenon, we compared the gene expression profiling of tumors derived from the representative bortezomib-sensitive cell line JeKo-1 and its derived bortezomib-resistant subclone JBR. A first inspection of gene expression profiling results indicated the upregulation of genes related to



**Figure 1.** Increased tumorigenicity of bortezomib-resistant cell lines is associated with plasmacytic differentiation. **(a)** A set of bortezomib-resistant (black curves) and bortezomib-sensitive (gray curves) MCL cell lines were subcutaneously inoculated into 3–9 SCID mice and tumor growth was recorded for up to 27 days. **(b)** Gene expression signatures of plasma-cell differentiation distinguish tumors derived from the representative, bortezomib-resistant cell line JBR, from tumors derived from the parental, bortezomib-sensitive cell line JeKo-1. The leading edge of each gene set is displayed in a heat map. NES, normalized enrichment score. **(c)** Changes in the expression of selected plasma-cell markers were confirmed by immunohistochemical staining of consecutive sections from tumors representative of each subgroup. Bortezomib-resistant tumors harbored several hallmarks of plasmacytic differentiation including increased IRF4 and Blimp-1 levels and decreased PAX5 expression, accompanied by an increase in mitotic index revealed by p-histone H3 staining and by the apparition of CCL3-secreting cells (white arrows) (magnification × 800).

plasma-cell differentiation and the downregulation of B-cell genes in JBR-derived tumors. To determine the significance of these changes, we performed gene set enrichment analysis with well-defined gene signatures of plasma-cell differentiation, as previously described.<sup>10</sup> All of these signatures were significantly

enriched in the tumors derived from JBR cells, indicating a shift from a B-cell to a plasmacytic gene expression program (Figure 1b). Immunohistological analysis confirmed that an increased mitotic index, as assessed by phospho-histone H3 labeling, was associated with marked upregulation of the



**Figure 2.** Antitumoral activity of lenalidomide is mediated by inhibition of the plasmacytic differentiation program in bortezomib-resistant MCL. (a) A set of nine MCL cell lines were incubated for 72 h with  $1 \mu\text{M}$  lenalidomide and cytotoxicity was assessed by MTT assay. The relative number of proliferating cells compared with untreated cells is presented as the mean (s.d.) of triplicate assays. (b) IRF4 protein downregulation after lenalidomide treatment ( $1 \mu\text{M}$ , 72 h) was analyzed by western blot in six representative bortezomib-resistant and bortezomib-sensitive MCL cell lines. Cell viability was assessed by cytofluorimetric detection of Annexin V-positive cells. (c) REC-1 cells treated as in b were analyzed by flow cytometry for their membrane levels of CD38;  $r$  values refer to the mean fluorescence ratio between the mean fluorescence intensity of the CD38-phycoerythrin (PE) signal in treated sample and untreated sample and an isotypic control, using untreated cells as a calibrator. (d) REC-1 cells were electroporated in the presence of *CRBN* or negative control siRNA and *CRBN* and IRF4 protein levels were evaluated by western blot.  $\beta$ -Actin was used as a loading control (upper panel). Transfected cells were either untreated or treated with  $5 \mu\text{M}$  lenalidomide for 72 h and cell proliferation was evaluated by MTT assay (lower panel). (e) REC-1 cells ( $10^7$  cells per mouse) were subcutaneously inoculated into the right flank of SCID mice. Tumor-bearing mice ( $n = 3-4$  mice per group) received intraperitoneal injections of 50 mg/kg lenalidomide or an equal volume of vehicle, 5 days a week, for 3 weeks. Tumor volumes were measured at the end of the treatment period with external calipers. (f) Representative tumor samples were then assessed by immunohistochemical staining for mitotic index (p-histone H3), angiogenesis (platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1)), plasmacytic differentiation (IRF4, CD38, Blimp-1 and CCL3) and B-cell related markers (PAX-5). White arrows: CCL3-producing cells (magnification  $\times 800$ ).

plasmacytic markers IRF4, Blimp-1 and CD38, together with a loss of the common B-cell markers PAX5 and CD19, in JBR versus JeKo-1 tumors (Figure 1c and Supplementary Figure S1A). IRF4 staining, scored by an expert pathologist in three degrees referring to the level of expression observed in plasma cells, revealed that in JeKo-1 tumors, 5% and 60% of the cells were scored as 3+/3 and 1+/3+, respectively, contrasting with JBR tumors where 50% of the cells were scored as 3+/3 and 40% of the cells as 2+/3+ (Figure 1c). In accordance with previously published data,<sup>10</sup> IRF4 was found to be a crucial regulator of MCL sensitivity to bortezomib as its siRNA-mediated downregulation significantly increased REC-1 cell response to the proteasome inhibitor (Supplementary Figure S2A). Further, as part of the IRF4 gene signature, JBR, but not JeKo-1 tumors exhibited an eightfold increase in *CCL3* mRNA and *CCL3* protein expression together with a sevenfold increase in *IRF4* mRNA (Figure 1c, Supplementary Figures S1A, S2B and S2C). In agreement with a physiological role of this chemokine in the regulation of IRF4/MYC signaling and MCL resistance to bortezomib, treatment of JeKo-1 cells with recombinant *CCL3* was shown to increase MYC expression and to limit the pro-apoptotic activity of bortezomib in these cells (Supplementary Figures S2D and S2E). Together, these results suggest that the acquisition of a plasmacytic phenotype by bortezomib-resistant MCL cells may confer increased tumorigenicity *in vivo*.

**Lenalidomide counteracts IRF4 upregulation and plasmacytic differentiation program in bortezomib-resistant cell lines and tumors**

As lenalidomide activity has been shown recently to rely on IRF4 downregulation in MM and ABC-DLBCL,<sup>19,21</sup> we assessed whether the drug could exert such activity in MCL cells resistant to bortezomib. Figure 2a and Table 1 show an inverse correlation between the response to lenalidomide and the degree of sensitivity to bortezomib in a panel of nine MCL cell lines. Indeed, lenalidomide was found to be significantly ( $P=0.01$ ) more active in bortezomib-resistant cells where it exerted an average cytostatic effect of 33.6%, when compared with the bortezomib-sensitive subset of cell lines (mean effect: 4.8%). This phenomenon was associated with a remarkable inhibition of IRF4 overexpression in bortezomib-resistant cells exposed to lenalidomide, while the lower, basal IRF4 levels observed in the bortezomib-sensitive cells were almost unmodified by the treatment (Figure 2b). Accordingly, the cytofluorimetric quantification of CD38 revealed a 55% decrease in the expression of this marker in REC-1 cells exposed to lenalidomide, when compared with untreated cells (Figure 2c). To explore the requirement of *CRBN* for lenalidomide-mediated cytotoxicity and IRF4 downregulation, we selectively knocked down the *CRBN* gene in REC-1 cells by a siRNA approach prior lenalidomide treatment. When compared with cells transfected with a non-targeting siRNA, the combination of three different oligonucleotides against *CRBN* effectively blocked the synthesis of the protein, leading to IRF4 downregulation and a decrease in the antitumor activity of lenalidomide from 37 to 23.9% ( $P=0.01$ ; Figure 2d). Accordingly, in the absence of *CRBN*, lenalidomide-mediated decrease in IRF4 protein levels was partially impaired after a 72-h exposure to the drug (Supplementary Figure S3). Of note, IRF4 downregulation in *CRBN* knockdown cells was also associated with a slight increase (+19.5%) in the rate of apoptotic cells, underlying the dependence of REC-1 toward this factor for their survival (Figure 2d). Thus, as previously described in MM and ABC-DLBCL cell lines, the *in vitro* activity of lenalidomide in bortezomib-resistant MCL cell lines may involve the downregulation of IRF4 in a *CRBN*-dependent manner.

To validate these results *in vivo*, CB17-SCID mice bearing REC-1 cell-derived tumors were randomly assigned to treatment with

**Table 1.** Drug sensitivity of MCL cell lines

Cell line	Bortezomib sensitivity	Lenalidomide cytotoxicity at 72h (% of control)	CP1203 $GI_{50}$ at 72h ( $\mu\text{M} \pm \text{s.d.}$ )
JVM-2	Sensitive	<1	0.21 ± 0.02
Z-138	Sensitive	8.5	0.14 ± 0.01
Granta-519	Sensitive	<1	0.71 ± 0.03
JeKo-1	Sensitive	<1	0.26 ± 0.05
UPN-1	Sensitive	12.6	0.08 ± 0.002
REC-1	Resistant	45.7	0.21 ± 0.03
Mino	Resistant	16.4	0.06 ± 0.03
JBR	Resistant	44.1	0.18 ± 0.05
ZBR	Resistant	28.1	0.19 ± 0.06

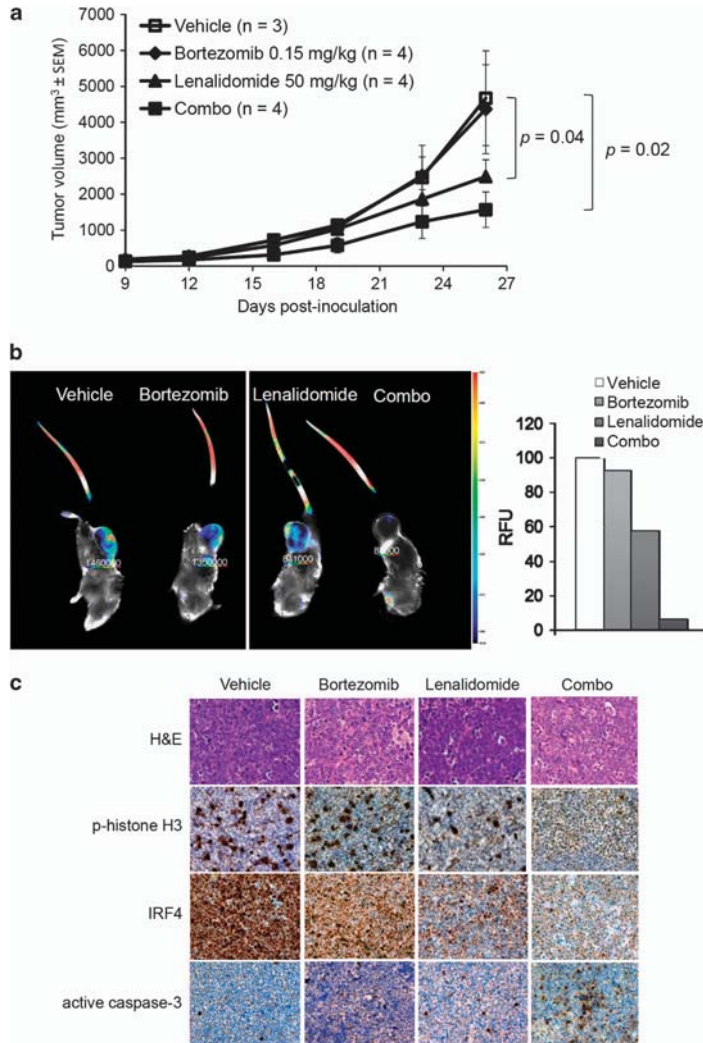
Abbreviation: MCL, mantle cell lymphoma.

lenalidomide (50 mg/kg, daily) or vehicle. As shown on figure 2e, after 3 weeks of treatment, tumors from lenalidomide-treated mice had a significant ( $P=0.04$ ) lower volume than tumors from the vehicle group. The immunohistochemistry analysis of representative tumor sections revealed that lenalidomide therapy efficiently reduced the hallmarks of bortezomib resistance and aggressiveness in REC-1 tumors, such as phospho-histone H3, IRF4, CD38, Blimp-1 and *CCL3*, and restored the expression of PAX5 (Figure 2f and Supplementary Figure S1B). Western blot analysis of representative whole tumor specimens, indicated that IRF4 and its target gene MYC experimented a 35% and a 85% protein decrease after lenalidomide therapy, respectively (Supplementary Figure S1E). In addition, the interferon-regulated genes *CXCL10* and *CXCL11* were the most downregulated genes in lenalidomide-receiving tumors among a panel of 90 genes related to immune regulation (data not shown), in agreement with previous findings in ABC-DLBCL cells.<sup>20</sup> Finally, lenalidomide was also able to reduce the length and number of intramural tumor blood vessels, as shown by a reduction in platelet endothelial cell adhesion molecule-1 staining (Figure 2f and Supplementary Figure S1B). Thus, lenalidomide activity appeared to be stronger in MCL cell lines and tumors resistant to bortezomib, mediated by the downregulation of IRF4 and plasma-cell-related antigens and cytokines, and impaired angiogenesis.

**Lenalidomide is able to overcome bortezomib resistance *in vivo***

In an attempt to assess whether lenalidomide could reverse MCL resistance to bortezomib *in vivo*, mice inoculated with REC-1 cells as above were assigned to four different treatment arms: bortezomib 0.15 mg/kg twice per week, lenalidomide 50 mg/kg daily, a combination of both agents or equal volume of vehicle. Although administration of bortezomib as a single agent did not affect tumor burden, mice receiving lenalidomide showed a 45% reduction in tumor growth when compared with vehicle group (Figure 3a). This effect was greatly enhanced by the addition of bortezomib to lenalidomide, reaching a 37% and 67% tumor decrease when compared with lenalidomide and vehicle arms, respectively, in the absence of drug-related toxicity. Accordingly, although tumor metabolism was almost unaffected by bortezomib treatment, lenalidomide and lenalidomide plus bortezomib therapies led to a 43% and a 94% reduction in glucose uptake, respectively, indicative of synergy between these two compounds *in vivo* (Figure 3b). The histological analysis of the corresponding tumors confirmed a stronger reduction of tumor mitotic index by the combination therapy, together with a profound downregulation of IRF4 (Figure 3c and Supplementary Figure S1C). Importantly, although some degree of apoptosis could be detected by means of activated-caspase-3 staining in the lenalidomide, but not in the control or bortezomib arms, the tumors from combination-receiving mice showed a remarkable accumulation of apoptotic





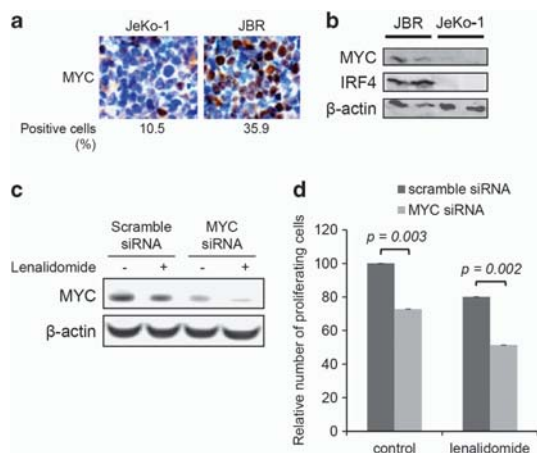
**Figure 3.** Lenalidomide overcomes bortezomib resistance *in vivo*. **(a)** Mice were inoculated with REC-1 cells as previously described and began treatment at day 9 post-inoculation with 50 mg/kg lenalidomide, 0.15 mg/kg bortezomib, both agents or equal volume of vehicle. Lenalidomide was administered 5 days a week and bortezomib twice a week, for up to 18 days. **(b)** Left panel, intratumoral glucose uptake was evaluated in representative mice injected intravenously with an IR800-labeled 2-deoxy glucose probe 24 h prior killing, and visualized with an Odyssey infra-red scanner (Li-Cor, Lincoln, NE, USA). Right panel, relative fluorescence quantification by means of the Image Studio software (Li-Cor) shows markedly reduced glucose uptake in tumor masses from mice receiving lenalidomide or the lenalidomide–bortezomib combination, when compared with either vehicle- or bortezomib-treated animals. **(c)** Immunohistochemical staining of consecutive sections from representative tumors, pointing out the synergistic downregulation of IRF4 and proliferation, and induction of apoptosis by the lenalidomide and bortezomib combination in REC-1-derived tumors (magnification  $\times 200$ ).

cells (Figure 3c and Supplementary Figure S1C). Taking together, these results suggest that the bortezomib–lenalidomide combination is able to overcome bortezomib resistance of MCL tumors *in vivo*, via the inhibition of IRF4 expression, impaired cellular proliferation and induction of apoptosis.

A role for MYC in the response of bortezomib-resistant cells to lenalidomide

According to the above results, bortezomib-resistant MCL may present several similarities with myeloma cells in terms of IRF4

expression and response to lenalidomide. As MYC has been described as a direct target gene of IRF4 in this latest model,<sup>13</sup> we further assessed the levels of this oncogene in bortezomib-resistant MCL tumors and its role in lenalidomide-treated cells. Figures 4a and b show that MYC was upregulated in JBR versus JeKo-1 tumors, in agreement with the difference in mitotic index previously observed between the two sets of tumors. Accordingly, a two- to threefold increase in MYC mRNA levels was detected by quantitative reverse transcriptase-PCR in JBR and REC-1-derived tumors when compared with JeKo-1-derived specimen, indicative of a transcriptional upregulation of the gene (Supplementary Figure S4). To further



**Figure 4.** Role of MYC expression in MCL cell sensitivity to bortezomib and lenalidomide. **(a)** Immunohistochemical detection of increased MYC nuclear levels in bortezomib-resistant vs bortezomib-sensitive tumors (magnification  $\times 800$ ). **(b)** Western blot analysis of JBR and JeKo-1 tumor samples (two samples per group) confirming the accumulation of MYC, in addition to IRF4, in bortezomib-resistant MCL tumors. **(c)** MYC siRNA and scrambled non-silencing siRNA were transferred to REC-1 cells by electroporation and MYC protein levels were evaluated by western blot.  $\beta$ -Actin was used as a loading control. **(d)** Transfected cells were either untreated or treated for 48 h with  $1 \mu\text{M}$  lenalidomide, after which time cell proliferation was evaluated by MTT assay.

characterize the role of MYC in the response of bortezomib-resistant MCL cells to lenalidomide, we used a siRNA approach to selectively downregulate MYC protein synthesis in REC-1 cells, followed by a 48-h treatment with lenalidomide. The specific MYC-targeting oligonucleotide used was able to abrogate MYC expression in REC-1 cells, compared with cells transfected with a non-targeting siRNA (Figure 4c). MYC knockdown was then shown to induce a 20% reduction in REC-1 cell proliferation. When combined with lenalidomide, we observed a complementary downregulation of MYC and an enhanced antiproliferative effect that reached 50% (Figures 4c and d). Thus, in addition to IRF4 expression, MYC upregulation appears to be a hallmark of MCL resistance to bortezomib, and may condition MCL response to lenalidomide.

The BET bromodomain inhibitor CPI203 exerts cytostatic effect and synergistically increased lenalidomide-induced apoptosis in MCL cells

Based on the recent demonstration that pharmacologic inhibition of MYC is achievable through targeting bromodomain and extra terminal (BET) family of chromatin adapters,<sup>26,27</sup> we assessed the possible role of MYC in the response of MCL to lenalidomide by evaluating the anti-proliferative activity of CPI203, a potent, selective and competitive small molecule inhibitor of BET proteins.<sup>28,29</sup> As shown in Figure 5a and Table 1, CPI203 exerted a cytostatic effect in the nanomolar range in all the nine MCL cell lines analyzed, independently of their sensitivity to either bortezomib or lenalidomide, with a mean  $\text{GI}_{50}$  value at 72 h of  $0.23 \mu\text{M}$  (range:  $0.06\text{--}0.71 \mu\text{M}$ ). At this concentration, the cytotoxicity of the compound in normal peripheral blood mononuclear cells from healthy donors was below 25%, thus demonstrating its selectivity. Treatment with  $0.5 \mu\text{M}$  CPI203 in two representative bortezomib-resistant MCL cell lines with high MYC basal levels (REC-1, JBR) and two representative bortezomib-sensitive MCL cell lines harboring lower expression of the oncogene (GRANTA-519 and JVM-2), effectively reduced MYC expression in all the samples

without inducing apoptosis (Figure 5b). This effect was mediated by the repression of MYC gene transcription, as confirmed by quantitative reverse transcriptase-PCR (data not shown). We then assessed whether CPI203 treatment could enhance MCL response to lenalidomide. The four bortezomib-resistant MCL cell lines REC-1, MINO, JBR and ZBR, together with four lenalidomide-sensitive primary cultures, were treated with a  $0.1$  or  $0.5 \mu\text{M}$  dose of CPI203, followed by a 72-h exposure to  $1$  or  $5 \mu\text{M}$  lenalidomide, and the CI values were calculated. At both  $0.1$  and  $0.5 \mu\text{M}$  doses, CPI203 exerted a synergistic cytotoxic effect with lenalidomide  $5 \mu\text{M}$  on all the samples analyzed. For lenalidomide–CPI203  $0.1 \mu\text{M}$  combination, the median CI was  $0.35$  (range:  $0.19\text{--}0.57$ ) in the cell lines and  $0.39$  (range:  $0.07\text{--}0.56$ ) in the primary cultures. For lenalidomide–CPI203  $0.5 \mu\text{M}$  combination, the median CI was  $0.5$  (range:  $0.29\text{--}0.55$ ) in the cell lines and  $0.52$  (range:  $0.05\text{--}0.64$ ) in the primary cultures. Figure 5c shows representative data obtained from REC-1 cells and primary cells from MCL patient #4. Consistently, while lenalidomide alone could partially reduce MYC expression, together with IRF4, in REC-1 cells, the combination of both agents almost completely abrogated the expression of both factors (Figure 5d). Of note, CPI203 single-agent treatment also appeared to slightly affect IRF4 expression (Figure 5d), underlying a possible retro-control of IRF4 expression by MYC in bortezomib-resistant MCL cells, as previously reported in myeloma cells.<sup>30</sup> Importantly, lenalidomide or CPI203 alone activated the apoptotic program in these cells only marginally (see Figures 2b and 5b), whereas the combination of both drugs achieved an apoptotic response in  $>70\%$  of the cells (Figure 5d), suggesting that simultaneous targeting of IRF4 and MYC by lenalidomide and BET inhibition efficiently activates the cell death program in MCL cells resistant to bortezomib.

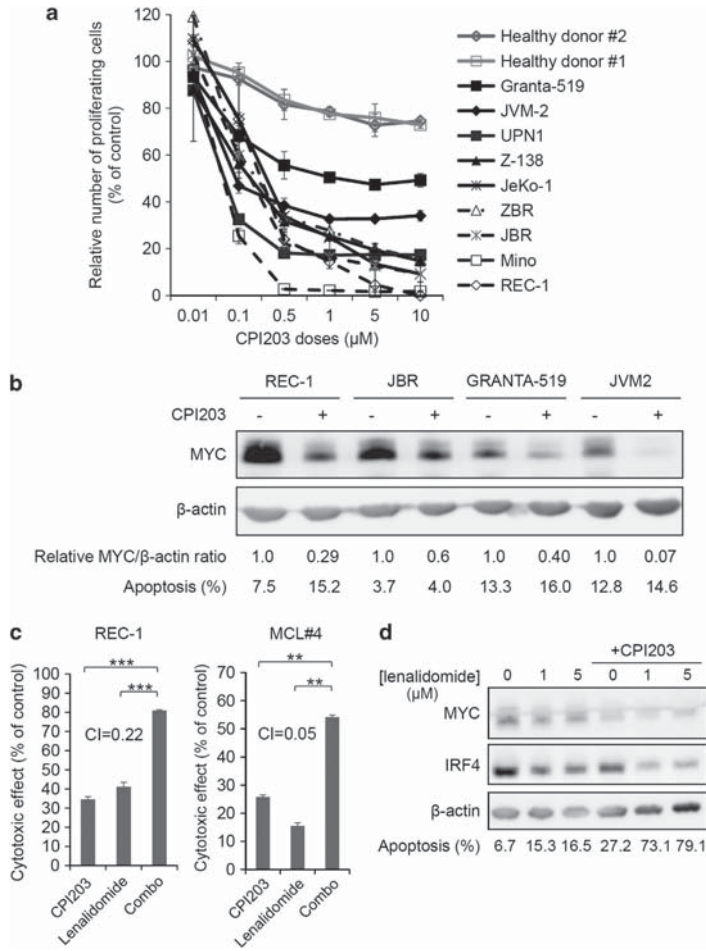
The CPI203–lenalidomide combination synergistically inhibits the growth of bortezomib-resistant tumors *in vivo*

To further characterize *in vivo* the synergistic role of lenalidomide and CPI203, SCID mice inoculated with REC-1 cells were randomly assigned into drug-treated (lenalidomide  $50 \text{ mg/kg}$  daily, CPI203  $2.5 \text{ mg/kg}$  BID, combo) and vehicle-treated groups. As shown in Figure 6a, while lenalidomide alone achieved a 41% reduction in tumor volume when compared with vehicle group, this effect reached 44% and 62% in mice receiving CPI203 and the lenalidomide–CPI203 combination, respectively. Similar results were obtained using a JBR-induced xenotransplant model of MCL (data not shown). Accordingly, tumor glucose uptake was reduced to 40–45% in animals treated with either lenalidomide or CPI203, while this reduction reached 86% in the combo group (Figure 6b). Immunohistochemical analysis of the corresponding tumors confirmed a synergistic decrease in the mitotic index, together with the almost complete disappearance of both MYC- and IRF4-positive cells, and an accumulation of cleaved caspase-3-positive cells in the combo-receiving group (Figure 6c and Supplementary Figure S1D). These results confirmed our *in vitro* data, showing that the combination of lenalidomide with the BET inhibitor CPI203 synergistically augments the antitumoral properties of each single agent, thanks to the abrogation of MYC and IRF4 expression and the induction of apoptosis.

Altogether, our results suggest that exacerbated IRF4/MYC signaling is a hallmark of bortezomib resistance in *in vivo* models of MCL and that dual inhibition of IRF4 and MYC by means of lenalidomide and BET bromodomain inhibitor is a promising strategy that may warrant clinical activity in MCL cases refractory to proteasome inhibition.

## DISCUSSION

The mechanism of action of bortezomib in MCL is complex, as it affects many cellular processes as diverse as BCL-2 protein



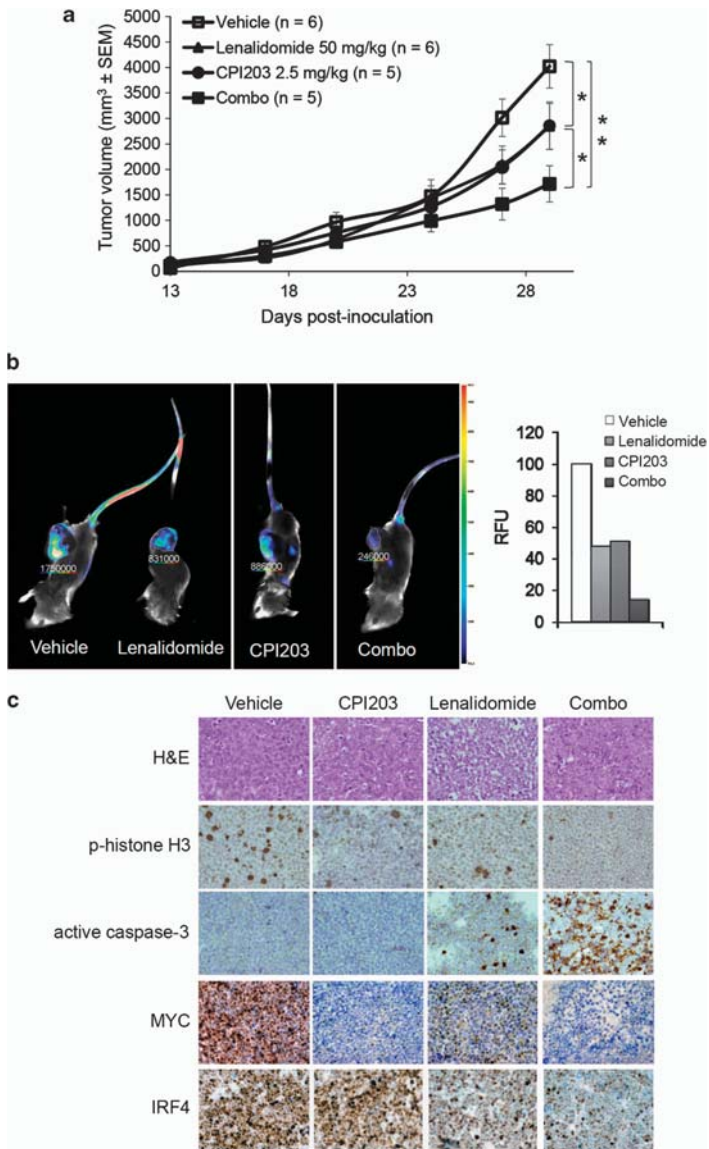
**Figure 5.** CPI203 synergistically induces apoptosis with lenalidomide in bortezomib-resistant cells. **(a)** A set of nine MCL cell lines and two peripheral blood mononuclear cell (PBMC) cultures from healthy donors were incubated for 72 h with increasing concentrations of CPI203 and cytotoxicity was assessed by MTT assay. The relative number of proliferating cells compared with control (untreated cells) are presented as the mean (s.d.) of triplicate assays. **(b)** Decreases in MYC protein levels after CPI203 (500 nM, 24 h) treatment was analyzed by western blot in four MCL cell lines. Cell viability was assessed by cytofluorimetric detection of Annexin V-positive cells. **(c)** Synergistic effect of lenalidomide and CPI203 combination in MCL cell lines and primary samples. Cells were treated for 72 h with 0.1–0.5  $\mu\text{M}$  CPI203 and/or 1–5  $\mu\text{M}$  lenalidomide. Cytotoxicity was determined by the MTT assay, and the CI values were calculated. Shown are the cytotoxicity and the CI values calculated after treating REC-1 cell with 0.1  $\mu\text{M}$  CPI203 and 5  $\mu\text{M}$  lenalidomide and primary cells from MCL case #4 with 0.5  $\mu\text{M}$  CPI203 and 5  $\mu\text{M}$  lenalidomide. **(d)** REC-1 cells were treated as above with 0.5  $\mu\text{M}$  CPI203 and 1–5  $\mu\text{M}$  lenalidomide. MYC and IRF4 levels were determined by western blot, and cell viability was determined by flow cytometry detection of annexin V binding.

modulation, reactive oxygen species production, endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response signaling.<sup>4</sup> This diversity of effects may explain, at least in part, the gap between the promising activity of the drug reported in the first preclinical studies and its clinical efficacy. This also illustrates the need for *in vivo* models of bortezomib resistance to validate the markers and combinational therapies identified by *in vitro* approaches.

Here, by analyzing the *in vivo* properties of a panel of seven MCL cell lines, including previously described cell lines with spontaneous or acquired resistance to the proteasome inhibitor,<sup>9</sup> we describe for the first time that drug-resistant MCL cell lines have increased tumorigenic properties *in vivo*, and that the increased aggressiveness of these tumors correlates with the expression of a plasmacytic differentiation program, being IRF4

a major regulator of this phenomenon.<sup>31,32</sup> This observation not only confirms the recent identification of plasma-cell differentiation as a surrogate of bortezomib resistance in MCL,<sup>10</sup> but it also links for the first time this phenotype with increased tumor angiogenesis, mitotic indexes and MYC expression levels.

Indeed, although MYC is not included in the different gene sets identified either by our *in vivo* gene set enrichment analysis or by the previous *in vitro* study,<sup>10</sup> we detected a threefold increase in MYC mRNA levels and a remarkable nuclear accumulation of the protein in JBR tumors. The evidence presented here suggests that the major mechanism of MYC upregulation in bortezomib-resistant tumors is the overexpression IRF4, as the downregulation of the oncogene is systematically observed after specific IRF4 knockdown *in vitro* (data not shown) and following the



**Figure 6.** CPI203 plus lenalidomide synergistically inhibits the growth of bortezomib-resistant tumors. **(a)** Twenty-four SCID mice were inoculated with  $10^7$  REC-1 cells as previously described. Tumor-bearing mice were randomly assigned to one of the following treatment arms ( $n = 5-6$  mice per group): lenalidomide 50 mg/kg daily, CP203 2.5 mg/kg BID, both agents or equal volume of vehicle, for 16 days. Tumor volumes were recorded each 3-4 days as previously. **(b)** Odyssey software pictures and corresponding fluorescence quantifications from representative mice at the day of killing. **(c)** Immunohistochemical labeling of p-histone H3, activated caspase-3, MYC and IRF4 in consecutive tissue sections from four representative tumor specimens (magnification  $\times 200$ ), illustrating the synergistic downregulation of IRF4, MYC and proliferation, and induction of apoptosis in tumors from mice receiving lenalidomide-CPI203 combination.

administration of lenalidomide *in vivo*. Beside the downregulation of MYC, this activity of lenalidomide toward IRF4 expression may allow MCL tumors to partially reverse the plasmacytic differentiation and to recover their sensitivity to bortezomib cytotoxic effect. Although such a decrease in IRF4 levels has been shown to be sufficient to induce apoptosis in MM and ABC-DLBCL cell lines exposed to similar doses of the immunomodulatory drug,<sup>13,19,20</sup> our present results show that lenalidomide alone

exerts mostly cytostatic effects in MCL cultures. In turn, we found that dual extinction of both IRF4 and MYC is required to achieve apoptotic processing *in vitro* and *in vivo*, and that both factors may represent important targets for the therapy of MCL patients, as described for MM patients.<sup>33</sup> Arguing in favor of this notion, IRF4 has been shown to be required for the survival of bortezomib-resistant MCL cells,<sup>10</sup> and overactivation of IRF4/MYC axis has been proposed as the 'Achilles' heel' of MM and ABC-DLBCL cells.<sup>13,20</sup>

MYC overexpression is associated with shorter survival in MCL patients, especially in those rare double-hit cases with a MYC-activating translocation and pleomorphic blastoid morphology.<sup>34</sup> First attempts of specific pharmacological inhibition of MYC activity were focused on the inhibition of its interaction with its co-factor MAX complexes by a small molecule approach that, despite a remarkable efficiency *in vitro*, could not maintain a significant inhibitory activity in *in vivo* models of Burkitt lymphoma with t(8;14)(q24;q32) activating translocation.<sup>35</sup> More recently, the use of (+)-JQ1, a highly potent, selective and cell permeable inhibitor of BRD4, a member of the BET family of chromatin adaptors, has shown antitumor activity in MM xenograft models, mediated by transcriptional inhibition of MYC.<sup>26,36</sup> BET proteins are transcriptional regulators that selectively recognize and bind to acetylated lysine residues in histones, and have an important role in cellular maintenance, proliferation, differentiation and activation. Their deregulation may result in various cancers, inflammatory diseases, metabolic diseases and tissue degeneration, involving the abnormal stimulation of transcriptional elongation of certain target genes including MYC and BCL2 oncogenes.<sup>36</sup> Further studies with (+)-JQ1 validated BET bromodomain targeting as a promising therapeutic strategy in BL,<sup>27</sup> glioblastoma,<sup>37</sup> erythroleukemia,<sup>38</sup> high-risk acute lymphoblastic leukemia<sup>39</sup> and in aggressive B-cell lymphoma.<sup>40</sup> CPI203 is a BET inhibitor that has shown superior bioavailability with oral or intraperitoneal administration.<sup>28,29</sup> We found MCL cells to be highly sensitive to CPI203 monotherapy, including bortezomib-resistant cell lines with increased MYC basal expression, where the compound achieved remarkable downregulation of the oncoprotein. We then demonstrated by both *in vitro* and *in vivo* approaches a meaningful synergistic effect of the CPI203–lenalidomide combination in MCL cases with intrinsic resistance to bortezomib, because of the capacity of CPI203 to facilitate lenalidomide-mediated downregulation of IRF4 and MYC.

Although the combination of lenalidomide with bortezomib is a rational one, given the clinical activity of both drugs in MCL, the combination of lenalidomide with such a BET protein bromodomain inhibitor is less obvious but may offer a glimpse into the potential opportunities that lenalidomide-based combinations hold for the treatment of patients with MCL refractory to bortezomib.

## CONFLICT OF INTEREST

P Sandy and E Normant are employees with stock ownership in Constellation Pharmaceuticals, Inc. The remaining authors declare no conflict of interest.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Bortezomib, lenalidomide and CPI203 were kindly provided by Millenium-Takeda Oncology, Celgene Corporation and Constellation Pharmaceuticals, respectively. This work was supported by grants from Fondo de Investigación Sanitaria (PI09/0060 and PI12/01847) (to G Roué), Ministerio de Economía y Competitividad (SAF 09/9503 and SAF 12/31242 to D Colomer; and SAF 11/29326 to P Pérez-Galán), Redes Temáticas de Investigación Cooperativa de Cáncer from the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (RD2006/20/014 and RD12/0036/0004) and Generalitat de Catalunya 20095GR967 (to D Colomer), European Regional Development Fund (ERDF) 'Una manera de hacer Europa'. A Moros and A Montraveta were recipients of pre-doctoral fellowships from IDIBAPS and Ministerio de Ciencia e Innovación (FPI), respectively. A Martínez was supported by Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigación Sanitaria and FEDER P111/00907.

## REFERENCES

- Jares P, Colomer D, Campo E. Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma. *J Clin Invest* 2012; **122**: 3416–3423.
- Perez-Galan P, Dreyling M, Wiestner A. Mantle cell lymphoma: biology, pathogenesis, and the molecular basis of treatment in the genomic era. *Blood* 2011; **117**: 26–38.

- Orlowski RZ, Kuhn DJ. Proteasome inhibitors in cancer therapy: lessons from the first decade. *Clin Cancer Res* 2008; **14**: 1649–1657.
- Xolalpa W, Perez-Galan P, Rodriguez MS, Roue G. Targeting the ubiquitin proteasome system: beyond proteasome inhibition. *Curr Pharm Des* 2013; **19**: 4053–4093.
- Fisher RI, Bernstein SH, Kahl BS, Djulbegovic B, Robertson MJ, de VS *et al*. Multicenter phase II study of bortezomib in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2006; **24**: 4867–4874.
- Goy A, Bernstein SH, Kahl BS, Djulbegovic B, Robertson MJ, de VS *et al*. Bortezomib in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma: updated time-to-event analyses of the multicenter phase 2 PINNACLE study. *Ann Oncol* 2009; **20**: 520–525.
- O'Connor OA, Moskowitz C, Portlock C, Hamlin P, Straus D, Dumitrescu O *et al*. Patients with chemotherapy-refractory mantle cell lymphoma experience high response rates and identical progression-free survivals compared with patients with relapsed disease following treatment with single agent bortezomib: results of a multicenter phase 2 clinical trial. *Br J Haematol* 2009; **145**: 34–39.
- Weniger MA, Rizzatti EG, Perez-Galan P, Liu D, Wang Q, Munson PJ *et al*. Treatment-induced oxidative stress and cellular antioxidant capacity determine response to bortezomib in mantle cell lymphoma. *Clin Cancer Res* 2011; **17**: 5101–5112.
- Roue G, Perez-Galan P, Mozos A, Lopez-Guerra M, Xargay-Torrent S, Rosich L *et al*. The Hsp90 inhibitor IPI-504 overcomes bortezomib resistance in mantle cell lymphoma *in vitro* and *in vivo* by down-regulation of the prosurvival ER chaperone BiP/Grp78. *Blood* 2011; **117**: 1270–1279.
- Perez-Galan P, Mora-Jensen H, Weniger MA, Shaffer III AL, Rizzatti EG, Chapman CM *et al*. Bortezomib resistance in mantle cell lymphoma is associated with plasmacytic differentiation. *Blood* 2011; **117**: 542–552.
- Iida S, Rao PH, Butler M, Corradini P, Boccadoro M, Klein B *et al*. Deregulation of MUM1/IRF4 by chromosomal translocation in multiple myeloma. *Nat Genet* 1997; **17**: 226–230.
- Pathak S, Ma S, Trinh L, Eudy J, Wagner KU, Joshi SS *et al*. IRF4 is a suppressor of c-Myc induced B cell leukemia. *PLoS One* 2011; **6**: e22628.
- Shaffer AL, Emre NC, Lamy L, Ngo VN, Wright G, Xiao W *et al*. IRF4 addiction in multiple myeloma. *Nature* 2008; **454**: 226–231.
- Goy A, Sinha R, Williams ME, Kalayoglu Besisik S, Drach J, Ramchandren R *et al*. Single-agent lenalidomide in patients with mantle-cell lymphoma who relapsed or progressed after or were refractory to bortezomib: phase II MCL-001 (EMERGE) study. *J Clin Oncol* 2013; **31**: 3688–3695.
- Vose JM, Habermann TM, Czuczman MS, Zinzani PL, Reeder CB, Tuscano JM *et al*. Single-agent lenalidomide is active in patients with relapsed or refractory aggressive non-Hodgkin lymphoma who received prior stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2013; **162**: 639–647.
- Witzig TE, Vose JM, Zinzani PL, Reeder CB, Buckstein R, Polikoff JA *et al*. An international phase II trial of single-agent lenalidomide for relapsed or refractory aggressive B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 2011; **22**: 1622–1627.
- Zinzani PL, Vose JM, Czuczman MS, Reeder CB, Haioun CF, Polikoff JF *et al*. Long-term follow-up of lenalidomide in relapsed/refractory mantle cell lymphoma: subset analysis of the NHL-003 study. *Ann Oncol* 2013; **24**: 2892–2897.
- Wang M, Fayad L, Wagner-Bartak N, Zhang L, Hagemeister F, Neelap SS *et al*. Lenalidomide in combination with rituximab for patients with relapsed or refractory mantle-cell lymphoma: a phase 1/2 clinical trial. *Lancet Oncol* 2012; **13**: 716–723.
- Lopez-Girona A, Heintel D, Zhang LH, Mendy D, Gaidarova S, Brady H *et al*. Lenalidomide downregulates the cell survival factor, interferon regulatory factor-4, providing a potential mechanistic link for predicting response. *Br J Haematol* 2011; **154**: 325–336.
- Yang Y, Shaffer III AL, Emre NC, Ceribelli M, Zhang M, Wright G *et al*. Exploiting synthetic lethality for the therapy of ABC diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell* 2012; **21**: 723–737.
- Zhang LH, Kosek J, Wang M, Heise C, Schafer PH, Chopra R. Lenalidomide efficacy in activated B-cell-like subtype diffuse large B-cell lymphoma is dependent upon IRF4 and cereblin expression. *Br J Haematol* 2013; **160**: 487–502.
- Zhu YX, Braggio E, Shi CX, Bruins LA, Schmidt JE, Van WS *et al*. Cereblin expression is required for the antitumorigenic activity of lenalidomide and pomalidomide. *Blood* 2011; **118**: 4771–4779.
- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein S *et al*. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*, 4th edn. International Agency for Research on Cancer: Lyon, France, 2008.
- Shaffer AL, Wright G, Yang L, Powell J, Ngo V, Lamy L *et al*. A library of gene expression signatures to illuminate normal and pathological lymphoid biology. *Immunity* 2006; **210**: 67–85.
- Rosich L, Xargay-Torrent S, Lopez-Guerra M, Campo E, Colomer D, Roue G. Counteracting autophagy overcomes resistance to everolimus in mantle cell lymphoma. *Clin Cancer Res* 2012; **18**: 5278–5289.

- 26 Delmore JE, Issa GC, Lemieux ME, Rahl PB, Shi J, Jacobs HM *et al*. BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. *Cell* 2011; **146**: 904–917.
- 27 Mertz JA, Conery AR, Bryant BM, Sandy P, Balasubramanian S, Mele DA *et al*. Targeting MYC dependence in cancer by inhibiting BET bromodomains. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; **108**: 16669–16674.
- 28 Devaiah BN, Lewis BA, Cherman N, Hewitt MC, Albrecht BK, Robey PG *et al*. BRD4 is an atypical kinase that phosphorylates Serine2 of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; **109**: 6927–6932.
- 29 King B, Trimarchi T, Reavie L, Xu L, Mullenders J, Ntziachristos P *et al*. The ubiquitin ligase FBXW7 modulates leukemia-initiating cell activity by regulating MYC stability. *Cell* 2013; **153**: 1552–1566.
- 30 Shaughnessy JD. Cancer: an unexpected addiction. *Nature* 2008; **454**: 172–173.
- 31 Feldman AL, Law M, Remstein ED, Macon WR, Erickson LA, Grogg KL *et al*. Recurrent translocations involving the IRF4 oncogene locus in peripheral T-cell lymphomas. *Leukemia* 2009; **23**: 574–580.
- 32 Mittrucker HW, Matsuyama T, Grossman A, Kundig TM, Potter J, Shahinian A *et al*. Requirement for the transcription factor LSIRF/IRF4 for mature B and T lymphocyte function. *Science* 1997; **275**: 540–543.
- 33 Dib A, Gabrea A, Glebov OK, Bergsagel PL, Kuehl WM. Characterization of MYC translocations in multiple myeloma cell lines. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2008 25–31.
- 34 Royo C, Salaverria I, Hartmann EM, Rosenwald A, Campo E, Bea S. The complex landscape of genetic alterations in mantle cell lymphoma. *Semin Cancer Biol* **21**: 322–334.
- 35 Clausen DM, Guo J, Parise RA, Beumer JH, Egorin MJ, Lazo JS *et al*. In vitro cytotoxicity and in vivo efficacy, pharmacokinetics, and metabolism of 10074-G5, a novel small-molecule inhibitor of c-Myc/Max dimerization. *J Pharmacol Exp Ther* 2010; **335**: 715–727.
- 36 Loven J, Hoke HA, Lin CY, Lau A, Orlando DA, Vakoc CR *et al*. Selective inhibition of tumor oncogenes by disruption of super-enhancers. *Cell* 2013; **153**: 320–334.
- 37 Cheng Z, Gong Y, Ma Y, Lu K, Lu X, Pierce LA *et al*. Inhibition of BET bromodomain targets genetically diverse glioblastoma. *Clin Cancer Res* 2013; **19**: 1748–1759.
- 38 Goupille O, Penglong T, Lefevre C, Granger M, Kadri Z, Fucharoen S *et al*. BET bromodomain inhibition rescues erythropoietin differentiation of human erythroleukemia cell line UT7. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; **429**: 1–5.
- 39 Ott CJ, Kopp N, Bird L, Paranal RM, Qi J, Bowman T *et al*. BET bromodomain inhibition targets both c-Myc and IL7R in high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2012; **120**: 2843–2852.
- 40 Zhao X, Lwin T, Zhang X, Huang A, Wang J, Marquez VE *et al*. Disruption of the MYC-miRNA-EZH2 loop to suppress aggressive B-cell lymphoma survival and clonogenicity. *Leukemia* 2013; **27**: 2341–2350.

Supplementary Information accompanies this paper on the Leukemia website (<http://www.nature.com/leu>)

**Supplemental Table 1.- Characteristics of MCL patients**

<b>Patient no.</b>	<b>Age/ Gender<sup>1</sup></b>	<b>Disease status</b>	<b>Histologic variant</b>	<b>Cell source<sup>2</sup></b>	<b>% tumoral cells<sup>3</sup></b>	<b>P53 status<sup>4</sup></b>
<b>MCL #1</b>	65/M	Diagnosis	classical	PB	96	n.d.
<b>MCL #2</b>	83/F	Diagnosis	classical	PB	92	del/mut
<b>MCL #3</b>	85/M	Diagnosis	classical	PB	85	wt
<b>MCL #4</b>	61/F	Relapse	classical	spleen	89	wt

<sup>1</sup> M: male; F: female.

<sup>2</sup> Source of the cells used in the *in vitro* analysis; PB, peripheral blood.

<sup>3</sup> % of tumor cells quantified by flow cytometry detection of CD19+/CD5+ cells.

<sup>4</sup> P53 mutational status assessed by FISH and direct sequencing. n.d.: not determined; del: deleted; mut: mutated; wt: wild type.

## **SUPPLEMENTAL MATERIALS AND METHODS**

### **Protein analysis from tumor specimen by SDS-PAGE**

Whole protein extracts were prepared from 2 representative tumors of each considered group with the use of T-PER lysis solution (Pierce). Briefly, 50 mg of tissue samples were resuspended in 400  $\mu$ L of lysis buffer complemented with protease and phosphatase inhibitors and incubated for 1 hour on ice. Samples were centrifuged at 15 000g for 15 minutes, and 50  $\mu$ g of supernatants were then analyzed by SDS-PAGE for MYC, IRF4 and  $\alpha$ -tubulin levels. Densitometric quantification was made by using the Image Gauge software (Fujifilm).

### **CCL3 quantification**

Whole protein extracts were prepared from representative JBR and JeKo-1 tumors using T-PER lysis solution as above. CCL3 concentrations in protein supernatants were quantified using a Milliplex<sup>®</sup> MAP kit (Millipore), according to the manufacturer's protocol. Briefly, 80  $\mu$ g of proteins were incubated with specific magnetic beads overnight with shaking in an assay microplate. After washing, secondary antibody was added and allowed to incubate for 60 minutes followed by the addition of streptavidin-PE. After allowing 30 minutes to elapse for reporter tag binding, the plate was washed again and after adding Sheath Fluid, the plate was read on a Luminex platform (Luminex Corporation).



## SUPPLEMENTAL FIGURE LEGENDS

### **Supplemental FIGURE S1.- Immunostaining quantification in MCL xenotransplant**

**tumors.** The percentages of positive cells in the different immunohistochemical panels used in Figure 1C (A), Figure 2F (B), Figure 3C (C) and Figure 6C (D), were determined using the color deconvolution algorithm of ImageJ software v1.45. (E) MYC and IRF4 protein levels were evaluated by Western blot analysis and densitometric quantification of MYC or IRF4 / $\alpha$ -tubulin ratio in tumor specimens from mice inoculated with either JeKo-1 cells, REC-1 cells, or with REC-1 cells followed by lenalidomide therapy. Shown are immunoblots and the corresponding quantification from 2 representative tumor samples per group.

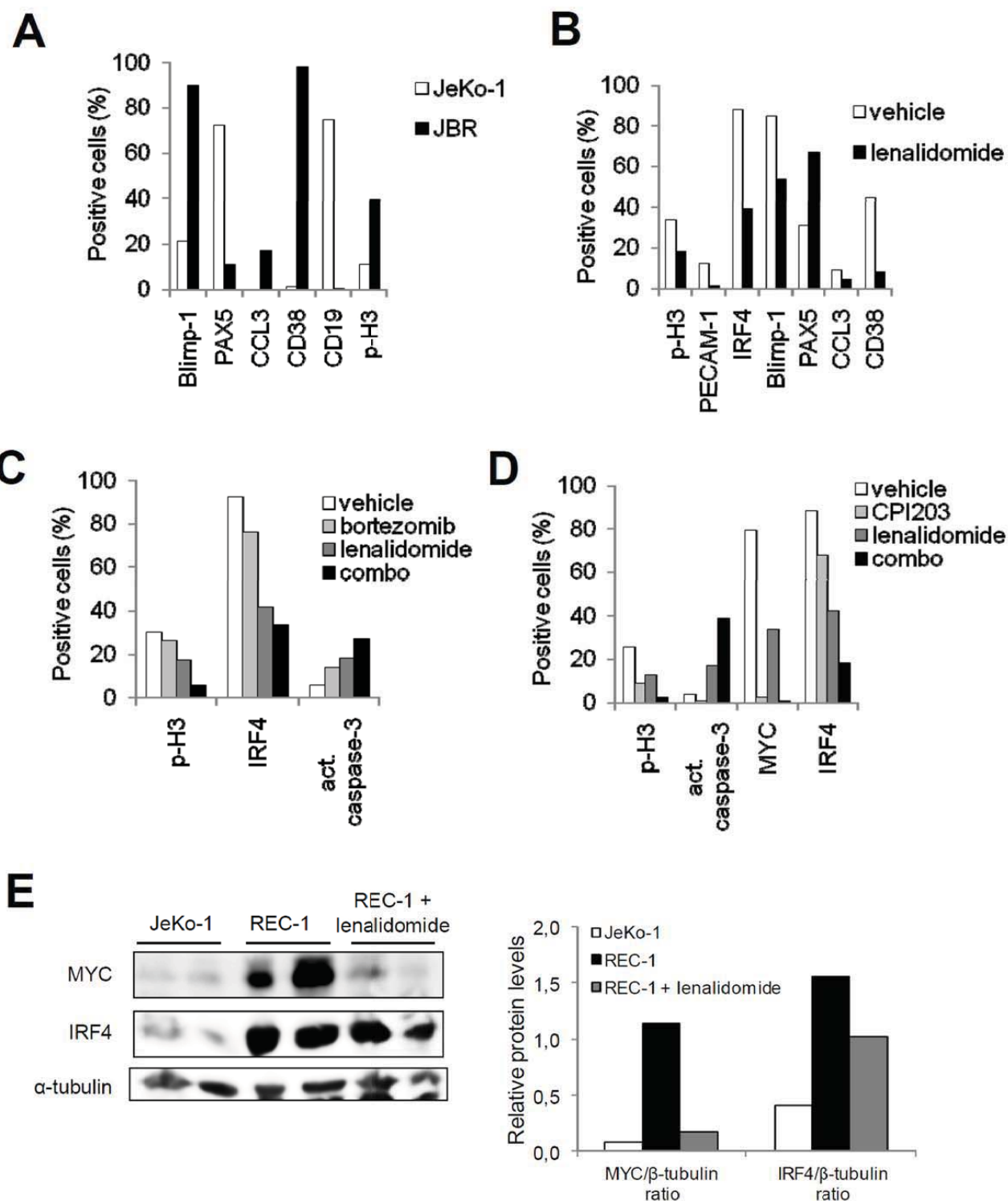
### **Supplemental FIGURE S2.-** (A) *IRF4* siRNA and scrambled non-silencing siRNA were

transferred to REC-1 cells by electroporation as described in Materials and Methods section and IRF4 protein levels were evaluated by Western blot.  $\beta$ -actin was used as a loading control. Transfected cells were either untreated or treated for 48 hours with 5 or 7.5 nM bortezomib, after which time cell proliferation was evaluated by MTT assay. (B) Relative accumulation of *CCL3* and *IRF4* transcripts in JBR vs. JeKo-1 tumors was evaluated by quantitative RT-PCR, using  $\beta$ -actin as an endogenous control gene and using JeKo-1-derived tumors as calibrators. (C) Enhanced secretion of CCL3 chemokine by JBR vs. JeKo-1 tumors was quantified by the Milliplex<sup>®</sup> assay. (D) JeKo-1 cells were treated for 6 hours with 200 ng/ml human recombinant CCL3 (rCCL3) (Sigma-Aldrich) and whole protein extracts were analyzed by SDS-PAGE for MYC levels, using Hsp90 (AC88, Enzo Life Sciences) as a loading control. (E) The bortezomib-sensitive cells JeKo-1 were treated for 24 h with 7.5 or 10 nM bortezomib in the presence or absence of 200 ng/ml rCCL3, after while apoptosis was evaluated by cytofluorimetric analysis of annexinV labelling.

**Supplemental FIGURE S3.** REC-1 cells were electroporated in the presence of *CRBN* or negative control siRNA, followed by a 72 hour culture in the presence or absence of 5  $\mu$ M lenalidomide, and IRF4 protein levels were evaluated by Western blot.  $\beta$ -actin was used as a loading control.

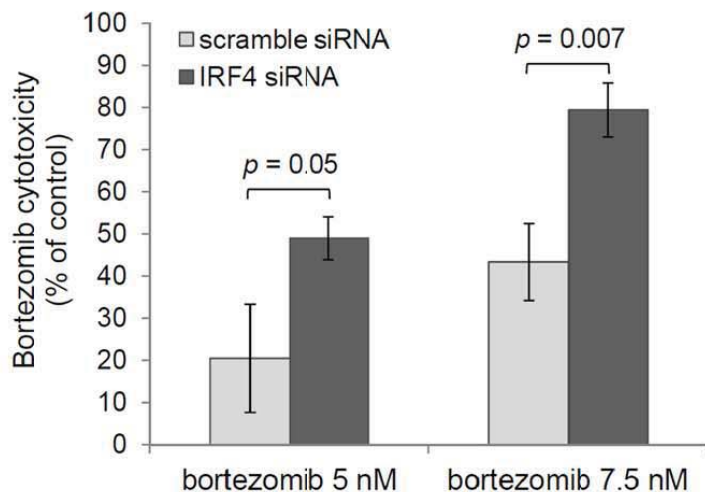
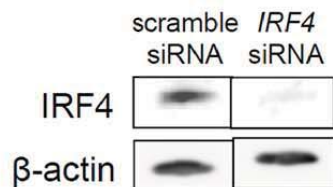
**Supplemental FIGURE S4.** *MYC* mRNA level increase quantified by real-time PCR in representative JBR and REC-1 tumors, using a representative JeKo-1-derived tumor as a calibrator cells.  $\beta$ -actin expression was used as an endogen control.

# Supplemental Figure S1

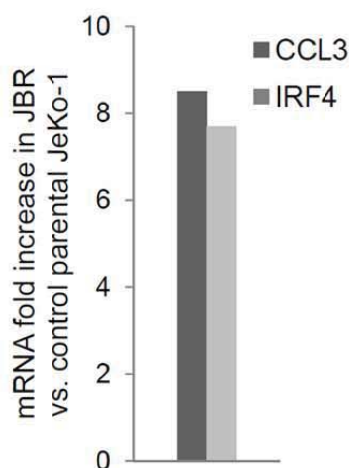


# Supplemental Figure S2

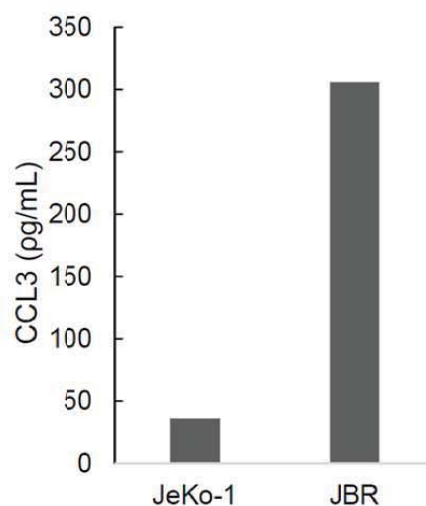
**A**



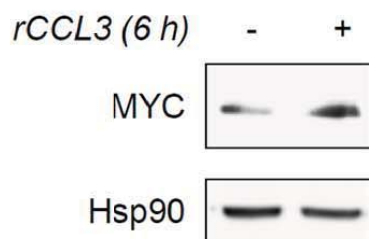
**B**



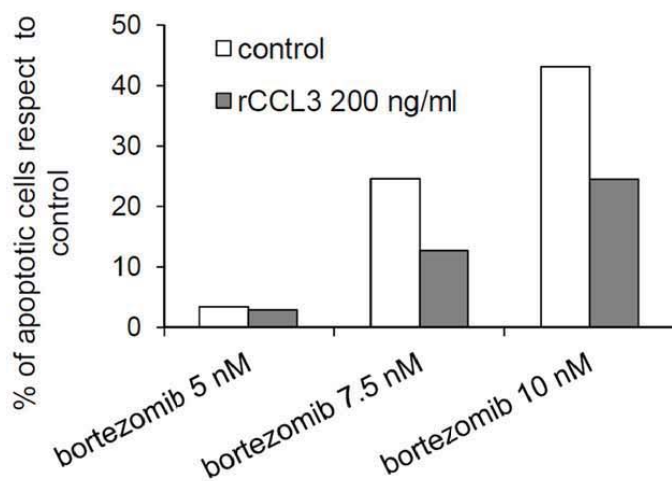
**C**



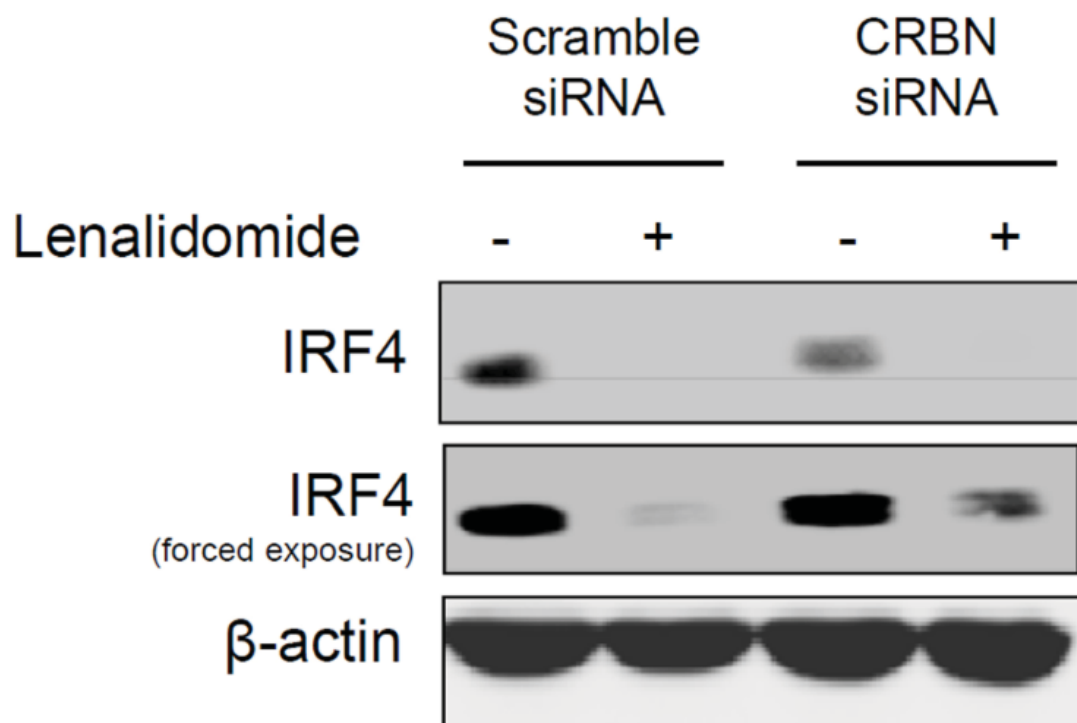
**D**



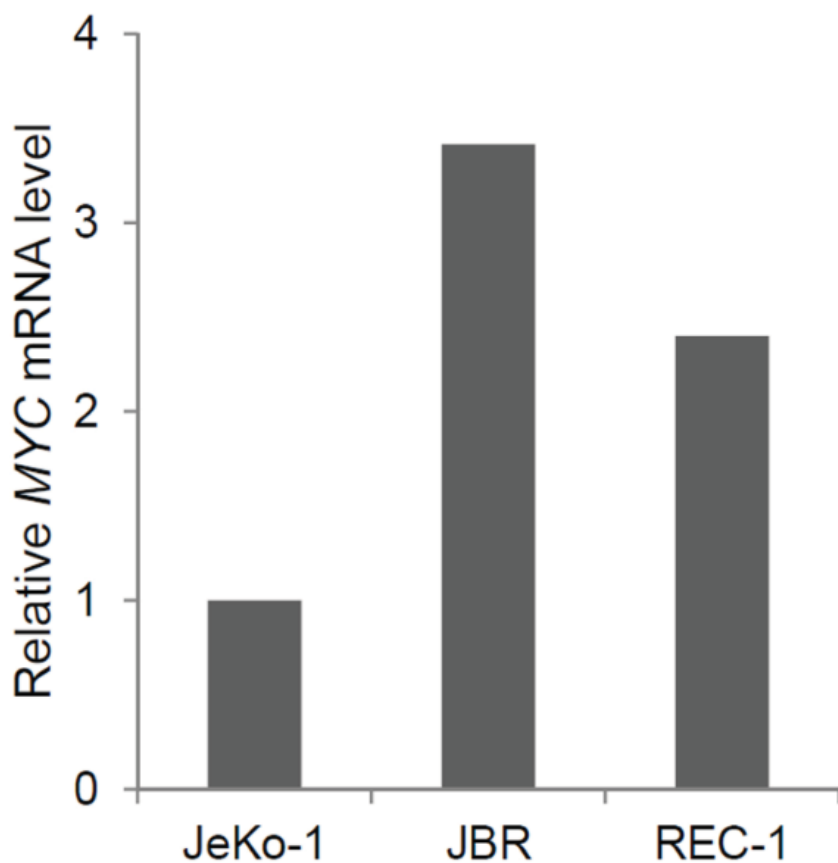
**E**



# Supplemental Figure S3



# Supplemental Figure S4





## **Resum dels resultats**

A continuació s'exposa un resum dels principals resultats obtinguts durant la realització d'aquesta tesi doctoral. La informació més extensa, així com les figures, poden ser consultades en els articles publicats inclosos en aquest document.

### **1. p27<sup>KIP1</sup> i ciclina D1 s'expressen simultàniament i interaccionen en les cèl·lules de MCL**

Els nivells de p27<sup>KIP1</sup> i ciclina D1 van ser analitzats en diferents mostres de MCL, incloent-hi un cas blastoide, sent aquest el que nivells més elevats de totes dues proteïnes va presentar. Es va desenvolupar un nou procediment per determinar els nivells d'aquestes proteïnes utilitzant citometria de flux. Independentment dels nivells de cada proteïna, p27<sup>KIP1</sup> va estar present en el complexos de ciclina D1/CDK4 en els 3 casos representatius en què es va dur a terme la immunoprecipitació. Els resultats confirmen que existeix una interacció física entre la ciclina D1 i p27<sup>KIP1</sup> que pot ser la base de la coexpressió de totes dues proteïnes, independentment del subtipus de MCL.

### **2. Alts nivells de ciclina D1 i p27<sup>KIP1</sup> estan associats amb una elevada tumorigenicitat del MCL *in vivo***

Es va estudiar la localització subcel·lular de la ciclina D1 i de p27<sup>KIP1</sup>. Totes les línies cel·lulars tenien expressió de totes dues proteïnes tant al nucli com al citosol. Però es van distingir dos grups: el primer, que incloqué REC-1, JBR i ZBR, totes tres resistents a bortezomib, amb alts nivells nuclears, i el segon, amb JeKo-1, JVM-2 i Z-138 (sent JeKo-1 i Z-138 les línies parentals de JBR i ZBR respectivament), sensibles a bortezomib i amb nivells nuclears més baixos. La interacció entre totes dues proteïnes va ser similar en els dos



grups. Per estudiar la implicació *in vivo* de presentar un increment dels complexos ciclina D1/p27<sup>KIP1</sup>, es van inocular cèl·lules JeKo-1 i JBR en ratolins immunodeprimits per tal de generar tumors subcutanis. Un cop els ratolins van ser sacrificats, els tumors van ser estudiats mitjançant immunohistoquímica i es va comprovar que existia una considerable acumulació nuclear de ciclina D1 i p27<sup>KIP1</sup> en els tumors JBR comparats amb els JeKo-1, a més d'un índex mitòtic superior. També s'observà més angiogènesi en aquests tumors. Sembla doncs, que la sobreexpressió de la ciclina D1 en cèl·lules de MCL no està associada amb la relocalització citoplasmàtica de p27<sup>KIP1</sup>, i que els casos amb major contingut de totes dues proteïnes són més susceptibles a generar tumors més agressius *in vivo*.

### **3. p27<sup>KIP1</sup> és estabilitzat després de la seva unió a la ciclina D1**

Fisiològicament, p27<sup>KIP1</sup> és una proteïna que es degrada ràpidament pel proteasoma si no està unida als complexos ciclina/CDK. Per conèixer si la unió a ciclina D1 pot estabilitzar p27<sup>KIP1</sup>, es van transfectar cèl·lules JeKo-1 amb siRNA per silenciar ciclina D1 i es van analitzar els nivells de ciclina D1 i de p27<sup>KIP1</sup> després de 48 hores. La disminució dels nivells de ciclina D1 en un 35 % van resultar en una disminució del 60 % de p27<sup>KIP1</sup>. També en quatre línies cel·lulars representatives es va veure que la vida mitjana de la ciclina D1 era més curta que la de p27<sup>KIP1</sup>, suggerint que primer té lloc la degradació de ciclina D1 i després la de p27<sup>KIP1</sup>. Això porta a pensar que la ciclina D1 té un paper de protecció davant la degradació proteasomal resultant en l'estabilització de p27<sup>KIP1</sup>.

### **4. La lenalidomida trenca els complexos de ciclina D1/p27<sup>KIP1</sup> *in vitro***

Ateses les observacions publicades en mieloma múltiple, es va comprovar la capacitat de la lenalidomida per disminuir els nivells de ciclina D1 també en

el MCL. Les cèl·lules REC-1 es van tractar amb l'IMiD i després es van analitzar els complexos de ciclina D1. Es va veure com va ser capaç, a part d'induir apoptosi, de disminuir la unió de la ciclina D1 a p27<sup>KIP1</sup>, sense alterar la unió d'aquesta a CDK4. Per immunofluorescència es va demostrar que la disminució nuclear de p27<sup>KIP1</sup> provocada per la lenalidomida tenia lloc alhora que succeïa una redistribució citosòlica d'aquesta proteïna. En sintonia amb aquesta troballa, les cèl·lules tractades augmentaven els nivells de p27<sup>KIP1</sup> fosforilada en Thr198, és a dir, la forma citosòlica de p27<sup>KIP1</sup>. Tot plegat suggereix que la lenalidomida és capaç de vèncer *in vitro* el segrest de p27<sup>KIP1</sup> per la ciclina D1, portant a la seva relocalització en al citosol i induint la mort cel·lular.

##### **5. L'activitat antitumoral de la lenalidomida *in vivo* involucra la inhibició de ciclina D1/p27<sup>KIP1</sup>**

També es va estudiar l'efecte de la lenalidomida *in vivo*, per tal d'elucidar la seva activitat sobre la progressió tumoral i l'angiogènesi. Es van inocular ratolins immunodeprimits amb cèl·lules JBR per generar tumors amb alts nivells de ciclina D1 i p27<sup>KIP1</sup>. Els ratolins tractats amb la lenalidomida van mostrar un creixement tumoral més lent comparat amb el grup control, arribant a un 40 % de reducció de volum tumoral al final del tractament. Els tumors van ser analitzats per immunohistoquímica i es va corroborar l'activació de la caspasa-3 amb el tractament així com una retracció vascular en comparar amb el control. A més, la lenalidomida també va induir la disminució de ciclina D1 i de p27<sup>KIP1</sup>, que va anar acompanyada de la fosforilació de p27<sup>KIP1</sup> en la Thr198. En conjunt, tot indica que la lenalidomida pot impedir el creixement de tumors amb nivells alts de ciclina D1 i p27<sup>KIP1</sup> *in vivo*, fent redistribuir p27<sup>KIP1</sup> des del nucli cap el citosol i induint apoptosi.

## **6. L'expressió i la localització de p27<sup>KIP1</sup> no es correlaciona amb el patró de proliferació de les cèl·lules de MCL**

Per tal d'analitzar la hipòtesi que en el MCL el cicle cel·lular i la proliferació no estan controlats per p27<sup>KIP1</sup>, es va determinar la localització subcel·lular de la proteïna en diferents línies cel·lulars en assajos *in vitro* i no es va trobar correlació entre el temps de duplicació i la quantitat de p27<sup>KIP1</sup> en el nucli. Tampoc no varen correlacionar el percentatge de cèl·lules en fase S i els nivells de p27<sup>KIP1</sup> o el rati p27<sup>KIP1</sup>/ciclina D1 nuclears. A continuació, es va investigar el rol de p27<sup>KIP1</sup> en cèl·lules primàries, de nou, en assajos *in vitro*. Com es va veure en les línies cel·lulars, tampoc no es va trobar correlació entre l'expressió de p27<sup>KIP1</sup> o el rati p27<sup>KIP1</sup>/ciclina D1 i el percentatge de cèl·lules en fase S. Considerant aquests resultats, es suggereix que p27<sup>KIP1</sup> i ciclina D1/p27<sup>KIP1</sup> poden no ser claus en la regulació de la proliferació en el MCL.

## **7. La resistència a bortezomib es correlaciona amb la diferenciació plasmocítica i amb una incrementada tumorigenicitat *in vivo***

Per investigar l'impacte de la resistència a bortezomib en el MCL es van inocular 6 línies cel·lulars en ratolins immunodeprimits i va ser estudiat el seu creixement. Aquelles línies resistents a bortezomib (REC-1, JBR i ZBR) van mostrar un creixement tumoral major que les línies sensibles (JeKo-1, Z-138, JVM-2 i GRANTA-519). Es van analitzar llavors els perfils d'expressió dels tumors JeKo-1 i JBR (la segona línia és derivada de la primera) i es va veure que en els tumors resistents a bortezomib hi havia expressió de gens propis de diferenciació plasmocítica que no eren presents en els tumors sensibles. L'anàlisi immunohistoquímica va descobrir un índex mitòtic incrementat en els tumors JBR respecte als de JeKo-1, així com marcadors característics de la diferenciació plasmocítica com IRF4, Blimp-1 i CD38, i la

pèrdua de marcadors de cèl·lula B com PAX5 i CD19. També, com a part de la signatura d'IRF4, els tumors JBR però no els JeKo-1 van mostrar nivells elevats tant de mRNA com de proteïna CCL3. Així doncs, hi ha evidències que l'adquisició del fenotip plasmocític en les cèl·lules de MCL resistent a bortezomib augmenta la seva tumorigenicitat *in vivo*.

#### **8. La lenalidomida contraresta l'increment d'IRF4 i la diferenciació plasmocítica en línies cel·lulars i tumors resistents a bortezomib**

Considerant la capacitat de la lenalidomida per disminuir IRF4 en altres models, es van tractar diferents línies cel·lulars amb l'IMiD i es va veure que el grau de resposta era superior en les línies resistents a bortezomib comparat amb les sensibles, i això es corresponia amb una disminució d'IRF4 i de CD38 en el grup resistent. Atesa la relació entre el cereblon i l'activitat de la lenalidomida en altres neoplàsies hematològiques, es va investigar el seu paper també en el MCL. Per fer-ho, es va produir el silenciament del gen amb siRNA específic i es va veure que la disminució de *CRBN* anava acompanyada de la disminució d'IRF4 i que tot plegat feia més resistents les cèl·lules a la lenalidomida, baixant la seva activitat del 37 % al 24 %. Sembla que l'activitat *in vitro* de la lenalidomida pot involucrar la disminució d'IRF4 d'una forma dependent a cereblon. Per tal de validar l'activitat de la lenalidomida *in vivo*, es van inocular ratolins SCID amb cèl·lules REC-1 i es van tractar amb el fàrmac. Després de tres setmanes de tractament, els ratolins tractats van presentar un volum tumoral significativament menor que el grup vehicle. L'estudi immunohistoquímic dels tumors va revelar que amb el tractament es va provocar una disminució de l'índex mitòtic així com un increment en l'apoptosi i es van incrementar els marcadors de cèl·lula B com PAX5 i perdre els marcadors de cèl·lula plasmàtica com IRF4, CD38 i Blimp-1 i també disminuir la quimiocina CCL3. A més, va ser remarcable la

capacitat antiangiogènica de la lenalidomida, que es va confirmar amb la disminució de PECAM-1. En resum, l'activitat de la lenalidomida sembla ser major en línies cel·lulars i tumors de MCL resistent a bortezomib, mitjançant la disminució d'IRF4 i d'altres antígens i citocines relacionades amb les cèl·lules plasmàtiques i impedit l'angiogènesi.

#### **9. La lenalidomida és capaç de vèncer la resistència a bortezomib *in vivo***

Per tal de comprovar l'eficàcia de la lenalidomida *in vivo* a l'hora de vèncer la resistència a bortezomib, es van inocular ratolins immunodeprimits amb cèl·lules REC-1 i es van tractar amb lenalidomida, bortezomib o amb la combinació. Mentre que el grup que va rebre la lenalidomida va presentar tumors un 45 % menors que el grup control, el grup amb la combinació va arribar a disminuir un 67 % el volum tumoral. La reducció del consum de glucosa en els tumors que van rebre la combinació també va ser notable (94 % en comparació amb el grup control). L'estudi immunohistològic revelà que la combinació va mostrar una important disminució en l'índex mitòtic, així com una evident reducció d'IRF4 i un increment de caspasa-3 activa, i per tant de l'apoptosi, quelcom que va tenir poca presència en l'administració dels fàrmacs com agents únics. Aquests resultats suggereixen que la combinació de la lenalidomida amb el bortezomib pot vèncer la resistència a bortezomib en els tumors de MCL *in vivo*, inhibint l'expressió d'IR4, impedit la proliferació cel·lular i induint l'apoptosi.

#### **10. Un rol per MYC davant la resposta a la lenalidomida de les cèl·lules resistents a bortezomib**

Ja que en altres models, com en el MM, es coneix l'associació entre IRF4 i MYC, vàrem voler estudiar el paper d'aquest gen també en el MCL. MYC es va trobar sobreexpressat en els tumors JBR en comparació amb els JeKo-1,

tant en l'àmbit proteic com de RNA missatger. Quan es va silenciar *MYC* amb siRNA específic en cèl·lules REC-1, i seguidament es van tractar amb lenalidomida, es va veure com, amb el siRNA de *MYC*, la proliferació va ser disminuïda i que aquest efecte va ser incrementat fins al 50 % amb la combinació amb l'IMiD. Per tant, no només IRF4 sembla ser un marcador important en la resistència a bortezomib en el MCL, sinó que també *MYC* té un rol rellevant i pot tenir implicació en la resposta a la lenalidomida.

#### **11. L'inhibidor del bromodomini BET, CPI203, exerceix efecte citostàtic i incrementa de forma sinèrgica l'apoptosi induïda per la lenalidomida en cèl·lules de MCL**

La inhibició farmacològica de *MYC* pot ser portada a terme amb l'ús d'inhibidors del bromodomini BET com CPI203. Es va testar aquest fàrmac en diferents línies cel·lulars i en cèl·lules mononuclears de sang perifèrica provinents de pacients sans per veure la seva activitat i es va comprovar que el fàrmac exercia la seva activitat citostàtica en l'ordre nanomolar, sent selectiu per les cèl·lules tumorals. El CPI203 va ser capaç de disminuir els nivells de *MYC* actuant a nivell transcripcional, tant en línies resistents a bortezomib com en sensibles, però no induí apoptosi. La combinació del CPI203 amb la lenalidomida va mostrar activitat sinèrgica tant en línies resistents a bortezomib com en mostres primàries. Mentre que la lenalidomida com agent únic va mostrar per *Western blot* la disminució d'IRF4 i parcialment la de *MYC*, la combinació amb CPI203 gairebé va abolir l'expressió de totes dues proteïnes i a més, va mostrar una notable inducció de l'apoptosi. Això suggereix que actuar sobre dues dianes com IRF4 i *MYC* amb l'ús de la lenalidomida i del CPI203 activa eficientment el programa de mort cel·lular en cèl·lules de MCL resistent a bortezomib.

## **12. La combinació de CPI203 i lenalidomida inhibeix de manera sinèrgica el creixement de tumors resistents a bortezomib *in vivo***

Per poder caracteritzar l'activitat sinèrgica de la lenalidomida i del CPI203 *in vivo*, es van inocular ratolins SCID amb cèl·lules REC-1 i es van tractar amb els fàrmacs com agents únics o en combinació. Al final del tractament la lenalidomida va aconseguir reduir el volum tumoral un 41 %, mentre que el CPI203 va aconseguir un 44 % (*vs.* el grup control). La combinació va aconseguir disminuir de forma sinèrgica el volum tumoral, arribant a un 62 % de disminució en comparació amb el grup control. També es van aconseguir resultats similars en un model generat amb cèl·lules JBR. El metabolisme de la glucosa va disminuir dràsticament en el grup de la combinació (86 % menor respecte al grup control). L'estudi mitjançant immunohistoquímica dels tumors va revelar que la combinació produí una disminució sinèrgica de l'índex mitòtic, així com gairebé la desaparició de cèl·lules MYC i IRF4 positives i l'acumulació de cèl·lules apoptòtiques. Aquests resultats confirmen les dades obtingudes *in vitro*, mostrant que la combinació de la lenalidomida amb l'inhibidor CPI203 augmenta de forma sinèrgica les propietats antitumorals de cada agent per separat gràcies a la reducció en l'expressió d'IRF4 i MYC i la inducció d'apoptosi.

DISCUSSIÓ





El limfoma de cèl·lules del mantell és una neoplàsia limfoide de comportament clínic heterogeni, en general de caràcter agressiu, i que actualment no disposa de tractament curatiu. Això comporta que es faci necessària una investigació més exhaustiva d'aquesta entitat i la recerca de noves dianes terapèutiques i de nous fàrmacs que portin solucions pel tractament d'aquesta malaltia en el futur.

Les actuals estratègies de tractament pel MCL es basen en la immunoquimioteràpia, que proporciona elevats ratis de resposta global. El problema recau en què les respostes no són duradores i es fan necessàries altres teràpies.(160)

Són necessaris nous fàrmacs que puguin aportar tractaments eficaços per aquesta entitat, i en aquesta línia, els fàrmacs immunomoduladors, com la lenalidomida, estan mostrant uns resultats esperançadors. En 2013 es va publicar un seguiment a llarg termini de l'assaig clínic NHL-003 (NCT00413036), en MCL, en què s'administrà la lenalidomida com agent únic en pacients tractats prèviament refractaris o amb recaigudes. Els resultats van corroborar l'activitat de la lenalidomida i van mostrar una toxicitat manejable, recolzant una continuïtat en la investigació sobre la lenalidomida en el MCL.(161)

Tot i els resultats optimistes de la lenalidomida en la clínica, encara no es coneixen del tot els mecanismes pels quals exerceix la seva acció. L'efecte immunomodulatori, antiangiogènic i apoptòtic de la lenalidomida estan relacionats tant amb l'activitat directa d'aquest fàrmac sobre vies de senyalització tumorals, com amb l'activitat indirecta, actuant sobre la interacció entre les cèl·lules tumorals i el microambient.(162)

Aquesta tesi pretén esclarir els mecanismes pels quals la lenalidomida exerceix el seu efecte en el MCL. Els estudis realitzats, tant *in vitro* com *in vivo*, demostren que el fàrmac té activitat tumoricida contra les cèl·lules B malignes, però també activitat antiangiogènica. Són resultats semblants als que s'han descrit també en el mieloma múltiple.(163)

En primer lloc, hem demostrat que en el MCL, la lenalidomida té efecte sobre la interacció entre la ciclina D1 i l'inhibidor del cicle cel·lular p27<sup>KIP1</sup>.

Segons els nostres resultats, totes dues proteïnes són expressades en el MCL, sent major l'expressió en el subtipus blastoide, més agressiu. De fet, els nivells de p27<sup>KIP1</sup> es correlacionen amb els nivells de ciclina D1 en tots els tumors i línies cel·lulars analitzats. Els nostres resultats fan pensar que, encara que p27<sup>KIP1</sup> per si mateix no està reconegut com un marcador de proliferació en els estudis d'expressió gènica, nivells elevats de ciclina D1 i p27<sup>KIP1</sup> podrien ser utilitzats per la identificació de tumors agressius.(21)

En contrast amb els tumors sòlids, on la sobreexpressió nuclear de la ciclina D1 indueix la relocalització de p27<sup>KIP1</sup> cap al citoplasma i augmenta la proliferació de les cèl·lules tumorals, les nostres dades indiquen que totes dues proteïnes es troben en el nucli de les cèl·lules B, mostrant un alt contingut en ciclina D1 nuclear.(35)

Existeix però, controvèrsia en els resultats perquè estudis anteriors donaven diferents anàlisis quant als nivells de p27<sup>KIP1</sup> detectats: Quintanilla-Martinez *et al*, presentaven que en el MCL clàssic, els nivells de p27<sup>KIP1</sup> detectats per immunohistoquímica, eren nuls o molt baixos i tenien, de forma genèrica, baixos nivells de proliferació. Paradoxalment, també s'havia descrit però, que les variants blastoides, més agressives i més proliferatives, tenien nivells més elevats de la proteïna inhibidora. Anys després, Chiarle *et al* van publicar que nivells no detectables o gairebé nuls de p27<sup>KIP1</sup> eren quelcom comú en el MCL

i que aquests nivells no es correlacionaven amb l'índex de proliferació però sí amb una disminució en la supervivència global. També Letestu *et al* van investigar sobre p27<sup>KIP1</sup> en el MCL, arribant a la conclusió que dues terceres parts de les mostres expressaven nivells baixos de p27<sup>KIP1</sup>, i que l'altre grup amb alts nivells de p27<sup>KIP1</sup> es caracteritzava per un curs indolent de la malaltia.(41, 164, 165)

Per tal d'explicar els controvertits resultats, es barregen dos possibles motius. El primer seria que en els estudis previs, la detecció de p27<sup>KIP1</sup> tenia una baixa sensibilitat i el segon que en els procediments no es distingia entre cèl·lules tumorals i cèl·lules no tumorals.

Pel que fa a la primera explicació, trobem que els estudis inicials que es van fer per IHQ podrien estar subestimant la quantitat de p27<sup>KIP1</sup> a la mostra, perquè més endavant, es va demostrar que, per *Western blot*, els nivells de p27<sup>KIP1</sup> no eren tan baixos en els casos de MCL clàssic, tot i que sí que eren més baixos que els que presentaven mostres de MCL blastoide o les línies cel·lulars. Una de les sospites que es varen plantejar per explicar aquest fet va ser que l'anticòs emprat per la tècnica de la IHQ no fos capaç de detectar p27<sup>KIP1</sup> quan es troba acomplexat amb ciclina/CDK. De fet, estudis d'immunoprecipitació van demostrar que l'anticòs que es va fer servir per les IHQ reconeixia pitjor el p27<sup>KIP1</sup> que formava complexos en una mostra de GRANTA-519 que el mateix p27<sup>KIP1</sup> que es trobava en la mostra després de desnaturalitzar-la, i per tant, un cop trencada la unió amb els complexos de ciclina D1.(42)

Quelcom semblant ja va ser descrit amb dos anticossos contra determinats epítops de p21<sup>CIP1</sup>, que a causa dels canvis de conformació que tenien lloc quan l'inhibidor s'unia a ciclina A/CDK2, no reconeixen degudament la proteïna.(166)

Quant al segon raonament, explicar que en el nostre cas, la detecció de la presència de p27<sup>KIP1</sup> en les mostres primàries, així com la correlació amb l'expressió de ciclina D1 va ser confirmada per una aproximació selectiva fent servir mostres enriquides en cèl·lules tumorals, per tal d'evitar la contaminació produïda per les cèl·lules B no cancerígenes.

Per explicar la raó per la qual les mostres tumorals de MCL analitzades mostren elevats continguts de ciclina D1 i també de l'inhibidor del cycle cel·lular p27<sup>KIP1</sup>, sobretot en els cassos més agressius, s'ha de tenir en compte que p27<sup>KIP1</sup> pràcticament no exerceix activitat inhibidora sobre el complex ciclina D1/CDK4, ja que és molt més eficaç inhibint els complexos de ciclina E/CDK2. Llavors, el segrest d'aquest per part del complex amb ciclina D1 té conseqüències positives en l'estimulació del progrés del cycle cel·lular: 1. Per una banda, el fet que no hi hagi p27<sup>KIP1</sup> lliure per inhibir els complexos de ciclina E/CDK2 permet la fosforilació del retinoblastoma per progressar a la fase S del cycle cel·lular. Estudis *in vitro* han demostrat que els fibroblasts NIH 3T3 que sobreexpressen ciclina D1 segresten més p27<sup>KIP1</sup> en els complexos ciclina D1/CDK4, facilitant l'activació inicial de la ciclina E/CDK2, que alhora promou la ubiquïtinització de p27<sup>KIP1</sup> i per tant, la seva degradació; i 2. Per l'altra banda s'estabilitzen els complexos de ciclina D1/CDK4, ja que la presència de p27<sup>KIP1</sup> en el complex incrementa 15 minuts la vida mitjana de la ciclina D1.(31, 167-169)

És conegut que p27<sup>KIP1</sup> és una proteïna inestable, que és degradada ràpidament pel proteasoma després de la seva dissociació dels complexos ciclina D1/CDK. Però tant en aquesta tesi doctoral com en estudis previs s'ha demostrat amb experiments de coimmunoprecipitació que en el MCL p27<sup>KIP1</sup> i ciclina D1 es mantenen units en condicions basals, independentment dels seus nivells d'expressió, i per tant p27<sup>KIP1</sup> s'escaparia en gran part de la

degradació gràcies a la protecció oferta pel complex, mantenint-se així elevats els nivells de la proteïna.(42, 170)

Sobre l'estabilitat de p27<sup>KIP1</sup>, el càlcul de la vida mitjana de la ciclina D1 i de p27<sup>KIP1</sup> va donar resultats semblants en totes les línies cel·lulars, sent el temps de vida mitjana inferior en la ciclina D1 que en p27<sup>KIP1</sup>. A més, com demostraren els assajos de transducció amb la proteïna de fusió TAT-ciclina D1, on TAT facilita l'entrada de la proteïna a través de la membrana cel·lular sense canvis transcendents en l'homeòstasi cel·lular, la presència *de novo* de ciclina D1 en cèl·lules B madures va acompanyar-se d'una regulació positiva de p27<sup>KIP1</sup>. A més, la degradació de p27<sup>KIP1</sup> té lloc després de la degradació de la ciclina D1. I també es va veure com la vida mitjana de p27<sup>KIP1</sup> va ser menor en les cèl·lules on l'expressió de la ciclina D1 va ser reduïda transitòriament. Tot plegat indica que, efectivament, en el MCL la degradació de p27<sup>KIP1</sup> no té lloc mentre que aquest es troba segregat per la ciclina D1.(171)

Atès que p27<sup>KIP1</sup> és degradada pel proteasoma, per tal d'explicar el perquè en els casos de MCL clàssic l'expressió de p27<sup>KIP1</sup> és menor que en els casos blastoides s'ha volgut relacionar amb una activitat d'ubiquitinització incrementada en els casos clàssics que, en comparació, permetria una expressió menor de p27<sup>KIP1</sup> i de ciclina D1, ja que es podrien degradar més ràpidament. Tot i això, estudis previs portats a terme en el nostre laboratori apunten, a més, cap a que l'activitat proteasomal no explica les diferències d'expressió de p27<sup>KIP1</sup> entre els casos més i menys agressius, ja que no es veu una activitat proteasomal disminuïda en les línies cel·lulars amb un major contingut de ciclina D1 i de p27<sup>KIP1</sup> com JBR i ZBR en comparació amb les seves línies parentals, JeKo-1 i Z-138; sent similar el contingut de substrats típics del proteasoma de proliferació i mort cel·lular com IκBα fosforilat, p53, p21<sup>CIP1</sup> i Mcl-1.(109, 164, 172)

També en relació a la degradació, malgrat que en l'estudi publicat per Chiarle *et al* es trobava una correlació inversa entre la proteïna *F-box Skp2*, que interacciona amb el complex ubiquitina ligasa E3 SCF i promou la degradació proteica, i p27<sup>KIP1</sup> en molts subtipus de limfoma, no es va trobar aquesta correlació en el MCL així com tampoc en un subconjunt del limfoma B difús de cèl·lula gran. En publicacions posteriors tampoc no es va aconseguir demostrar aquesta proteòlisi esbiaixada en el MCL conseqüència de l'expressió de Skp2. De fet, els nostres resultats tampoc no van en la direcció de la publicació de Chiarle *et al*, ja que hem vist que les línies cel·lulars més agressives tenen alhora una major expressió de MYC i són també les que tenen una major quantitat de p27<sup>KIP1</sup>. Atès que Skp2 està sota la regulació de MYC i augmenta amb l'expressió d'aquest, segons Chiarle *et al* hauríem de veure un rati invers entre MYC i p27<sup>KIP1</sup> i no és pas el que mostren les nostres dades.(173-175)

Tot i que l'esperat pel que s'ha vist en altres limfomes era una relació inversa entre l'expressió de p27<sup>KIP1</sup> i la proliferació, com hem dit, s'ha vist una relació directa amb elevats nivells del complex ciclina D1/p27<sup>KIP1</sup> i una elevada proliferació, encara més notable en les variants agressives de MCL. Llavors, és possible que aquest augment de p27<sup>KIP1</sup> reflecteixi un mecanisme de retroalimentació a causa de la sobreexpressió de ciclina D1. En el cas de la variant blastoide, la pèrdua freqüent d'altres gens del cicle cel·lular com p53, p16<sup>INK4a</sup> i p21<sup>CIP1</sup> pot ser la responsable de portar a increments compensatoris de p27<sup>KIP1</sup>.(26, 176)

Tot plegat, suggereix un possible rol de p27<sup>KIP1</sup> nuclear en la tumorigènesi *in vivo* dels tumors més agressius: els resultats obtinguts de la coexistència de totes dues proteïnes en nivells elevats van acompanyats també de dades que mostren un elevat índex mitòtic, una alta tumorigenicitat *in vivo* i resistència

a fàrmacs. Per contra, en les nostres observacions *in vitro* no hem vist correlació entre el percentatge de cèl·lules en fase S i el rati de ciclina D1/p27<sup>KIP1</sup> nuclears, ni a línies cel·lulars ni a mostres primàries, suggerint que en el MCL potser el complex format amb l'inhibidor i la ciclina no té efectes en la regulació de la proliferació, o almenys, que han d'existir mecanismes paral·lels que també hi intervinguin i puguin modular les conseqüències del segrest de p27<sup>KIP1</sup>. En aquest sentit, a partir de dades extretes d'estudis d'expressió gènica, no s'ha considerat p27<sup>KIP1</sup> com un marcador de la proliferació. De totes maneres, aquestes observacions *in vitro* poden diferir dels resultats *in vivo*. De fet *in vitro*, REC-1 és la única línia cel·lular que presenta acumulació en la fase del cicle cel·lular G2/M, mentre que *in vivo*, hi ha més línies cel·lulars que mostren un índex mitòtic elevat. Cal tenir en compte que les mostres primàries de pacients de les quals disposem són mostres *ex vivo* criopreservades que en ser descongelades pel seu ús i a més, en estar separades del microambient tumoral del pacient, perden alguns marcadors de proliferació. Això però, no té lloc en el cas dels tumors subcutanis que extirpem dels experiments *in vivo* amb ratolins, que segueixen conservant el microambient tumoral.(21, 177)

En el MCL, l'acció de la lenalidomida trencant els complexos ciclina D1/p27<sup>KIP1</sup>, principalment en l'àmbit nuclear, porta a l'acumulació citosòlica de la forma fosforilada inactiva de p27<sup>KIP1</sup>. A més, l'acumulació nuclear de totes dues proteïnes es correlaciona no només amb la tumorigenicitat *in vivo*, sinó també amb la sensibilitat a la lenalidomida tant *in vitro* com *in vivo*. Tot i que caldria un estudi més profund, els nivells alts de ciclina D1 i p27<sup>KIP1</sup> podrien servir per determinar la sensibilitat a lenalidomida en la clínica.(43)

N'és conegut que la forma citoplasmàtica de p27<sup>KIP1</sup> en té múltiples rols i està involucrada en diverses funcions cel·lulars, entre elles la motilitat cel·lular



modulant la via de RhoA i la polimerització de fibres d'estrès d'actina. També recentment, s'ha descrit que p27<sup>KIP1</sup> citosòlic està relacionat amb el control de l'estabilitat dels microtúbuls. Tot plegat, porta a la conclusió racional d'una possible teràpia combinada de lenalidomida i agents desestabilitzadors de microtúbuls.(35, 178, 179).

Tot i les troballes aconseguides, per tal de conèixer en profunditat les funcions de p27<sup>KIP1</sup> tant en el nucli com en el citosol en la patogènesi del MCL i el seu paper en l'activitat antitumoral de la lenalidomida són necessaris més estudis al respecte.

En relació al tercer treball publicat, tot i que la recerca ha fet que s'hagin creat fàrmacs amb bons resultats a la preclínica, la realitat és que, en passar a la clínica, alguns no deixen veure les qualitats tan prometedores que s'havien observat *in vitro* o en estudis amb animals. Un dels fàrmacs que podem incloure en aquest grup és el bortezomib. Estudis *in vitro* han demostrat que el bortezomib exerceix el seu efecte a través de l'actuació sobre diversos processos com la modulació de proteïnes de la família de Bcl-2, la producció de ROS, l'estrès en el reticle endoplasmàtic o la senyalització UPR. Potser la gran diversitat d'efectes explica el buit que existeix entre la prometedora activitat en la recerca preclínica i l'eficàcia clínica.(108)

Se sap que el desenvolupament de la resistència a bortezomib és adaptatiu, ja que té lloc de forma gradual i ve acompanyat d'un increment en la capacitat proteasomal i la sobreexpressió de la subunitat del proteasoma *beta type-5*, encara que previ al tractament no s'hagin descrit mutacions en el gen que la codifica, *PSMB5*. Un dels problemes que es presenten és que encara no es disposen de bons models de resistència a bortezomib *in vivo* per poder

validar els marcadors i tractaments que s'han identificat prèviament *in vitro*.(180, 181)

Nosaltres vam analitzar les propietats *in vivo* de 7 diferents línies cel·lulars de MCL, incloent-hi línies resistents a bortezomib tant de forma espontània com induïda.(109)

En aquesta tesi es descriu que les línies cel·lulars resistents a bortezomib tenen propietats tumorigèniques incrementades *in vivo*, i a més, que aquest increment en l'agressivitat es correlaciona amb l'expressió del programa de diferenciació plasmocítica. Un dels majors reguladors d'aquesta diferenciació que es troba incrementat en les línies cel·lulars resistents és IRF4, un factor de transcripció amb funcions crítiques durant el desenvolupament de la cèl·lula B, i que es necessita pel canvi d'isotip de les immunoglobulines, per la diferenciació plasmocítica i per la supervivència, entre d'altres.(182-185)

Aquest fet confirma part de la recerca ja publicada al respecte en línies cel·lulars, en què s'identifica una estreta relació entre la diferenciació plasmocítica i la resistència a bortezomib en el MCL.(112)

Si bé el MCL és considerat una neoplàsia de limfòcits verges que no han passat encara pel centre germinal, hi ha casos que mostren mutacions somàtiques en els gens de les immunoglobulines. Per tant, com a mínim part dels MCL deriven de cèl·lules que han estat en contacte amb l'antigen i que han passat pel centre germinal. També s'han descrit casos de MCL en què es veuen trets de diferenciació plasmocítica tot i presentar la translocació t(11;14).(186-190)

És curiosa, però, aquesta resistència associada a la diferenciació plasmocítica, ja que el bortezomib ha mostrat una bona activitat clínica en cèl·lules plasmàtiques clonals de pacients de mieloma múltiple i en pacients

d'amiloidosi sistèmica de cadenes lleugeres; i la inhibició del proteasoma és especialment tòxica en les cèl·lules secretores precisament perquè trenca un mecanisme clau en l'homeòstasi proteica.(191-193)

L'associació de la resistència a bortezomib a la diferenciació plasmocítica en el MCL recau només sobre algunes de les característiques de les cèl·lules plasmàtiques, com l'expressió del factor de transcripció IRF4 i del marcador de superfície CD38; però no altres com l'*splicing* de XBP1 i la incrementada producció d'immunoglobulines. Tot i que les cèl·lules de MCL no són secretores com les del MM, un subgrup d'aquestes podrien estar presentant una diferenciació parcial com a cèl·lula B plasmàtica que els hi fa adquirir una elevada capacitat de càrrega proteica i que els hi confereix resistència a la inhibició proteasomal.(112)

També hem demostrat la relació entre el fenotip de cèl·lula plasmàtica i l'increment de l'angiogènesi tumoral, l'índex mitòtic i alts nivells d'expressió de MYC. A més, tot i que MYC no està inclòs en els jocs de gens identificats *in vivo* en la nostra anàlisi GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*) ni en l'estudi previ *in vitro*, vam detectar un increment de 3 vegades en els nivells de mRNA de MYC així com una acumulació destacable en els tumors derivats de JBR.(112)

La sobreexpressió de MYC ha estat associada a un pronòstic més desfavorable pels pacients, descrivint-se casos *double hit* de MCL que presenten anormalitats activadores de MYC en el locus 8q24 i la morfologia de la variant blastoide, i que es caracteritzen una mitjana de supervivència de només 8 mesos.(194, 195)

En aquesta tesi se suggereix que el principal mecanisme pel qual existeix un increment de l'expressió de MYC en els tumors de MCL resistent a bortezomib és a través de l'elevada expressió d'IRF4 atès que la disminució

---

d'aquest oncogen, *MYC*, s'observà ràpidament després del *knockdown* d'IRF4 *in vitro* i també després de l'administració de lenalidomida *in vivo* (fàrmac que disminueix els nivells d'IRF4).

L'activitat de la lenalidomida en relació a la disminució de l'expressió d'IRF4 pot permetre als tumors de MCL revertir de manera parcial el programa de diferenciació plasmocítica i recuperar la sensibilitat al bortezomib.

Tant en línies cel·lulars de mieloma múltiple com en les del subtipus ABC del limfoma B difús de cèl·lula gran la disminució en l'expressió d'IRF4 ja és suficient per induir apoptosi. Per contra, *in vitro* nosaltres només veiem efecte citostàtic, acompanyat d'un petit percentatge de cèl·lules apoptòtiques.(66, 144, 149)

Atesa la importància que ha rebut en les darreres publicacions la proteïna cereblon, que en forma part d'un complex ubiquitina ligasa E3, també hem estudiat el rol que li correspon en el MCL davant l'acció de la lenalidomida. El descobriment de cereblon com a diana de la lenalidomida en el MM i en el DLBCL ha fet augmentar l'interès per aquesta proteïna com a possible biomarcador de sensibilitat als IMiD. Nosaltres hem vist que amb la inhibició de *CRBN* mitjançant l'ús de siRNA també s'indueix la disminució d'IRF4 i que tot plegat porta a una disminució de la resposta a la lenalidomida en cèl·lules de MCL, indicant que potser la lenalidomida exerceix la seva acció en reduir els nivells d'IRF4 d'una manera dependent a cereblon. En el cas de l'ABC-DLBCL, la lenalidomida exerceix la seva acció sobre la mort cel·lular d'una forma dependent de cereblon, augmentant la producció d'IFN $\beta$  (que és un dels efectes de la inhibició d'IRF4). A més el silenciament de *CRBN* comporta toxicitat cel·lular. En el cas del MM però, la inhibició de cereblon amb siRNA no va lligada a toxicitat cel·lular, però com en l'ABC-DLBCL, és necessària la presència de cereblon perquè la lenalidomida tingui el seu

efecte tòxic. Cal considerar que l'aproximació que fan servir en el DLBCL per tal de silenciar cereblon és mitjançant la transducció retroviral amb shRNA, quelcom que podria activar per si mateix la producció d'IFN i provocar la mort cel·lular. En contrast a això, en el cas del MCL, nosaltres hem fet servir siRNA, i tot i així també hem vist mort associada a la inhibició d'aquesta proteïna, no com té lloc en el MM. Es requereix més recerca sobre les funcions d'aquesta proteïna en les diferents entitats per poder relacionar la seva inhibició amb la inducció de mort cel·lular.(149, 150, 196, 197)

Tornant a l'expressió d'IRF4 i MYC, el que sí que vam trobar és que la inhibició de tots dos alhora sí que desencadena la resposta apoptòtica de la cèl·lula, tant *in vitro* com *in vivo*, i que tots dos factors semblen ser importants dianes a tenir en compte en el tractament del MCL, tal com també s'ha descrit prèviament pel MM.(198)

Ha estat descrit que IRF4 es requereix per la supervivència de les cèl·lules de MCL resistent a bortezomib i la súper activació de l'eix IRF4/MYC s'ha proposat com el "taló d'Aquiles" en el MM i en l'ABC-DLBCL.(66, 112, 149)

Per tant, una aproximació farmacològica atractiva consisteix en el desenvolupament d'inhibidors de MYC. Els primers intents que van sorgir per inhibir farmacològicament MYC van estar relacionats amb la inhibició de la seva interacció amb el cofactor Max mitjançant molècules petites. Tot i la remarcable eficiència que van mostrar *in vitro*, per exemple no van poder mantenir la inhibició en models *in vivo* de limfoma de Burkitt amb la translocació activadora t(8;14)(q24;q32).(199)

Més recentment, l'ús de (+)-JQ1, un potent i selectiu inhibidor de BRD4, un membre de la família BET d'adaptadors de cromatina, ha mostrat activitat antitumoral en models de xenotrasplantament de MM, mitjançant la inhibició de la transcripció de MYC.(54, 200)

Les proteïnes BET són reguladors de la transcripció que reconeixen de manera selectiva els residus de lisina acetilats a les histones i s'uneixen a ells. Tenen un important paper en el manteniment cel·lular, la proliferació, la diferenciació i l'activació. La seva desregulació està associada a diversos tipus de càncer, malalties inflamatòries, malalties metabòliques i degeneració tissular, involucrant l'estimulació anòmala de l'elongació de la transcripció de diversos gens diana com ara els oncogens *MYC* i *BCL2*.(54)

Altres estudis amb (+)-JQ1 han validat com a diana les proteïnes BET com estratègia terapèutica en alguns tumors com limfoma de Burkitt, glioblastoma, eritroleucèmia i leucèmia limfoblàstica aguda d'alt risc i en limfomes agressius de cèl·lula B.(201-205)

Un altre inhibidor de proteïnes BET que ha mostrat grans resultats fins al moment ha estat el CPI203, que presenta millor biodisponibilitat tant en l'administració oral com intraperitoneal.(65)

Els nostres resultats evidencien que les cèl·lules de MCL són sensibles al CPI203 com agent únic, incloent-hi aquelles resistents a bortezomib, que tenen elevats nivells basals de *MYC*. Tot i aquesta sobreexpressió, CPI203 és capaç de disminuir els nivells de forma considerable.

També hem demostrat, tant *in vitro* com *in vivo*, que la combinació de la lenalidomida amb el CPI203 en els casos resistents a bortezomib té com a conseqüència un efecte sinèrgic que promou la disminució d'IRF4 i *MYC* alhora.

Mentre que es pot considerar que la combinació de la lenalidomida amb el bortezomib és una combinació racional, possiblement la combinació de l'IMiD amb el CPI203 no es veu tan evident, però tot i així pot oferir una nova alternativa de tractament per aquells casos de MCL resistent a bortezomib.

En definitiva, podem dir que el desenvolupament farmacològic en oncologia ha evolucionat en els darrers anys cap a la identificació de noves dianes moleculars específiques, que permetin el disseny de fàrmacs capaços d'interaccionar amb elles i així provocar una resposta selectiva. És per això que sorgeix una clara necessitat per entendre els mecanismes que hi ha sota el procés neoplàsic. L'aprofundiment en el coneixement de les vies moleculars tindrà un gran impacte assistencial, possibilitant identificar d'una forma més acurada els pacients que podran beneficiar-se dels nous tractaments i per tant, guanyant-li una batalla més al càncer.

# CONCLUSIONS





Les conclusions extretes d'aquesta tesi doctoral són:

1. La ciclina D1 i p27<sup>KIP1</sup> s'expressen alhora en les cèl·lules del limfoma de cèl·lules del mantell i existeix una relació física entre elles.
2. La ciclina D1 i p27<sup>KIP1</sup> s'expressen tant al nucli com al citosol de les línies cel·lulars de MCL *in vitro*.
3. Aquelles línies cel·lulars que expressen més alts nivells de ciclina D1 i p27<sup>KIP1</sup> en el nucli *in vitro*, també ho fan *in vivo*, i això està associat a un fenotip tumoral més agressiu.
4. La ciclina D1 té un paper de protecció sobre p27<sup>KIP1</sup> davant la seva degradació proteasomal, resultant en l'estabilització de la proteïna.
5. La lenalidomida, un fàrmac immunomodulatori, és capaç de dissociar el complex ciclina D1/p27<sup>KIP1</sup> *in vitro*, ocasionant la relocalització de p27<sup>KIP1</sup> des del nucli cap al citosol.
6. També *in vivo*, la lenalidomida indueix una disminució de la ciclina D1 i promou la distribució de p27<sup>KIP1</sup> en el citosol.
7. A diferència del que s'ha observat *in vivo*, no hi ha correlació entre els nivells nuclears de p27<sup>KIP1</sup> i la proliferació cel·lular ni entre els nivells nuclears de p27<sup>KIP1</sup> i el percentatge de cèl·lules en fase S en línies de MCL *in vitro*. Tampoc no hi ha correlació entre el rati p27<sup>KIP1</sup>/ciclina D1 amb el percentatge de cèl·lules en fase S, suggerint que en models *in vitro* de MCL aquestes proteïnes poden no estar regulant la proliferació.
8. Tampoc no hi ha correlació entre l'expressió de p27<sup>KIP1</sup> o el rati p27<sup>KIP1</sup>/ciclina D1 i el percentatge de cèl·lules en fase S en mostres primàries, recolzant la idea que aquestes dues proteïnes no estan implicades en la regulació de la proliferació en models *in vitro* de MCL.

9. L'adquisició d'un fenotip plasmocític en cèl·lules de MCL resistent a bortezomib, confereix un augment de la tumorigenicitat *in vivo*.
10. La lenalidomida té un paper major en línies i tumors de MCL resistent a bortezomib, portada a terme mitjançant la disminució d'IRF4 i d'antígens i citocines relacionades amb la diferenciació plasmocítica, alhora que impedeix també l'angiogènesi.
11. No només la sobreexpressió d'IRF4 està associada a la resistència a bortezomib, sinó que també la sobreexpressió de MYC té un rol important.
12. El CPI203, un inhibidor de proteïnes BET, així com la lenalidomida, gairebé no activen el programa d'apoptosi cel·lular quan s'administren en monoteràpia *in vitro*.
13. La combinació de la lenalidomida amb el CPI203 *in vitro* aconsegueix activar el programa apoptòtic en cèl·lules de MCL resistent a bortezomib i ho fa mitjançant la disminució d'IRF4 i MYC alhora.
14. *In vivo*, la combinació de la lenalidomida i el CPI203 augmenta de forma sinèrgica les propietats antitumorals de cada agent per separat, tot inhibint l'expressió d'IRF4 i MYC i induint apoptosi.

Per sintetitzar, podem dir que l'activitat dels fàrmacs immunomoduladors, en concret de la lenalidomida, ha presentat esperançadors resultats antitumorals en el limfoma de cèl·lules del mantell, tant en models *in vitro* com *in vivo*, suggerint un futur prometedor a la clínica, sobretot en aquells casos resistents als inhibidors del proteasoma, com el bortezomib, on ha mostrat ser especialment eficaç a l'hora de sensibilitzar els pacients.

# BIBLIOGRAFIA



1. Sudhakar A. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *Journal of cancer science & therapy*. 2009;1(2):1-4.
2. Ramón Colomer B, Cortés Funes H. *Tratado de Oncología*: Publicaciones Permanyer; 2009. 2308 p.
3. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*. 2011;117(19):5019-32.
4. Young RM, Staudt LM. Targeting pathological B cell receptor signalling in lymphoid malignancies. *Nature reviews Drug discovery*. 2013;12(3):229-43.
5. Jares P, Colomer D, Campo E. Genetic and molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: perspectives for new targeted therapeutics. *Nature reviews Cancer*. 2007;7(10):750-62.
6. Jares P, Colomer D, Campo E. Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122(10):3416-23.
7. Smedby KE, Hjalgrim H. Epidemiology and etiology of mantle cell lymphoma and other non-Hodgkin lymphoma subtypes. *Seminars in cancer biology*. 2011;21(5):293-8.
8. Caballero D, Campo E, Lopez-Guillermo A, Martin A, Arranz-Saez R, Gine E, et al. Clinical practice guidelines for diagnosis, treatment, and follow-up of patients with mantle cell lymphoma. Recommendations from the GEL/TAMO Spanish Cooperative Group. *Annals of hematology*. 2013;92(9):1151-79.
9. Perez-Galan P, Dreyling M, Wiestner A. Mantle cell lymphoma: biology, pathogenesis, and the molecular basis of treatment in the genomic era. *Blood*. 2011;117(1):26-38.

10. Hitz F, Bargetzi M, Cogliatti S, Lohri A, Taverna C, Renner C, et al. Diagnosis and treatment of mantle cell lymphoma. *Swiss medical weekly*. 2013;143:w13868.
11. Vose JM. Mantle cell lymphoma: 2013 Update on diagnosis, risk-stratification, and clinical management. *American journal of hematology*. 2013;88(12):1082-8.
12. Palomero J, Vegliante MC, Rodriguez ML, Eguileor A, Castellano G, Planas-Rigol E, et al. SOX11 promotes tumor angiogenesis through transcriptional regulation of PDGFA in mantle cell lymphoma. *Blood*. 2014.
13. Xu W, Li JY. SOX11 expression in mantle cell lymphoma. *Leukemia & lymphoma*. 2010;51(11):1962-7.
14. Fernandez V, Salamero O, Espinet B, Sole F, Royo C, Navarro A, et al. Genomic and gene expression profiling defines indolent forms of mantle cell lymphoma. *Cancer research*. 2010;70(4):1408-18.
15. Chen RW, Bemis LT, Amato CM, Myint H, Tran H, Birks DK, et al. Truncation in CCND1 mRNA alters miR-16-1 regulation in mantle cell lymphoma. *Blood*. 2008;112(3):822-9.
16. Wiestner A, Tehrani M, Chiorazzi M, Wright G, Gibellini F, Nakayama K, et al. Point mutations and genomic deletions in CCND1 create stable truncated cyclin D1 mRNAs that are associated with increased proliferation rate and shorter survival. *Blood*. 2007;109(11):4599-606.
17. Knudsen KE, Diehl JA, Haiman CA, Knudsen ES. Cyclin D1: polymorphism, aberrant splicing and cancer risk. *Oncogene*. 2006;25(11):1620-8.
18. Vaites LP, Lian Z, Lee EK, Yin B, DeMicco A, Bassing CH, et al. ATM deficiency augments constitutively nuclear cyclin D1-driven genomic instability and lymphomagenesis. *Oncogene*. 2014;33(1):129-33.

19. Beltran E, Fresquet V, Martinez-Useros J, Richter-Larrea JA, Sagardoy A, Sesma I, et al. A cyclin-D1 interaction with BAX underlies its oncogenic role and potential as a therapeutic target in mantle cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(30):12461-6.
20. Roue G, Pichereau V, Lincet H, Colomer D, Sola B. Cyclin D1 mediates resistance to apoptosis through upregulation of molecular chaperones and consequent redistribution of cell death regulators. *Oncogene*. 2008;27(36):4909-20.
21. Rosenwald A, Wright G, Wiestner A, Chan WC, Connors JM, Campo E, et al. The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma. *Cancer cell*. 2003;3(2):185-97.
22. Tchakarska G, Le Lan-Leguen A, Roth L, Sola B. The targeting of the sole cyclin D1 is not adequate for mantle cell lymphoma and myeloma therapies. *Haematologica*. 2009;94(12):1781-2.
23. Klier M, Anastasov N, Hermann A, Meindl T, Angermeier D, Raffeld M, et al. Specific lentiviral shRNA-mediated knockdown of cyclin D1 in mantle cell lymphoma has minimal effects on cell survival and reveals a regulatory circuit with cyclin D2. *Leukemia*. 2008;22(11):2097-105.
24. Salaverria I, Royo C, Carvajal-Cuenca A, Clot G, Navarro A, Valera A, et al. CCND2 rearrangements are the most frequent genetic events in cyclin D1(-) mantle cell lymphoma. *Blood*. 2013;121(8):1394-402.
25. Hernandez L, Bea S, Pinyol M, Ott G, Katzenberger T, Rosenwald A, et al. CDK4 and MDM2 gene alterations mainly occur in highly proliferative and aggressive mantle cell lymphomas with wild-type INK4a/ARF locus. *Cancer research*. 2005;65(6):2199-206.



26. Hernandez L, Fest T, Cazorla M, Teruya-Feldstein J, Bosch F, Peinado MA, et al. p53 gene mutations and protein overexpression are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas. *Blood*. 1996;87(8):3351-9.
27. Bretones G, Delgado MD, Leon J. Myc and cell cycle control. *Biochimica et biophysica acta*. 2014.
28. Pinyol M, Bea S, Pla L, Ribrag V, Bosq J, Rosenwald A, et al. Inactivation of RB1 in mantle-cell lymphoma detected by nonsense-mediated mRNA decay pathway inhibition and microarray analysis. *Blood*. 2007;109(12):5422-9.
29. Zafonte BT, Hult J, Amanatullah DF, Albanese C, Wang C, Rosen E, et al. Cell-cycle dysregulation in breast cancer: breast cancer therapies targeting the cell cycle. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2000;5:D938-61.
30. LaBaer J, Garrett MD, Stevenson LF, Slingerland JM, Sandhu C, Chou HS, et al. New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes & development*. 1997;11(7):847-62.
31. Cheng M, Olivier P, Diehl JA, Fero M, Roussel MF, Roberts JM, et al. The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *The EMBO journal*. 1999;18(6):1571-83.
32. Hershko DD. Cyclin-dependent kinase inhibitor p27 as a prognostic biomarker and potential cancer therapeutic target. *Future Oncol*. 2010;6(12):1837-47.
33. Vlach J, Hennecke S, Amati B. Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *The EMBO journal*. 1997;16(17):5334-44.
34. Nakayama KI, Nakayama K. Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nature reviews Cancer*. 2006;6(5):369-81.

35. Larrea MD, Wander SA, Slingerland JM. p27 as Jekyll and Hyde: regulation of cell cycle and cell motility. *Cell cycle*. 2009;8(21):3455-61.
36. Larrea MD, Liang J, Da Silva T, Hong F, Shao SH, Han K, et al. Phosphorylation of p27Kip1 regulates assembly and activation of cyclin D1-Cdk4. *Molecular and cellular biology*. 2008;28(20):6462-72.
37. Bustany S, Tchakarska G, Sola B. Cyclin D1 regulates p27(Kip1) stability in B cells. *Cellular signalling*. 2011;23(1):171-9.
38. Fujita N, Sato S, Katayama K, Tsuruo T. Akt-dependent phosphorylation of p27Kip1 promotes binding to 14-3-3 and cytoplasmic localization. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(32):28706-13.
39. Fujita N, Sato S, Tsuruo T. Phosphorylation of p27Kip1 at threonine 198 by p90 ribosomal protein S6 kinases promotes its binding to 14-3-3 and cytoplasmic localization. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(49):49254-60.
40. Kim J, Jonasch E, Alexander A, Short JD, Cai S, Wen S, et al. Cytoplasmic sequestration of p27 via AKT phosphorylation in renal cell carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15(1):81-90.
41. Quintanilla-Martinez L, Thieblemont C, Fend F, Kumar S, Pinyol M, Campo E, et al. Mantle cell lymphomas lack expression of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor. *The American journal of pathology*. 1998;153(1):175-82.
42. Quintanilla-Martinez L, Davies-Hill T, Fend F, Calzada-Wack J, Sorbara L, Campo E, et al. Sequestration of p27Kip1 protein by cyclin D1 in typical and blastic variants of mantle cell lymphoma (MCL): implications for pathogenesis. *Blood*. 2003;101(8):3181-7.

43. Chu IM, Hengst L, Slingerland JM. The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. *Nature reviews Cancer*. 2008;8(4):253-67.
44. Baldassarre G, Belletti B, Nicoloso MS, Schiappacassi M, Vecchione A, Spessotto P, et al. p27(Kip1)-stathmin interaction influences sarcoma cell migration and invasion. *Cancer cell*. 2005;7(1):51-63.
45. Cotterman R, Jin VX, Krig SR, Lemen JM, Wey A, Farnham PJ, et al. N-Myc regulates a widespread euchromatic program in the human genome partially independent of its role as a classical transcription factor. *Cancer research*. 2008;68(23):9654-62.
46. Ross SJ, Critchlow SE. Emerging approaches to target tumor metabolism. *Current opinion in pharmacology*. 2014;17C:22-9.
47. Wahlstrom T, Henriksson MA. Impact of MYC in regulation of tumor cell metabolism. *Biochimica et biophysica acta*. 2014.
48. Prochownik EV, Vogt PK. Therapeutic Targeting of Myc. *Genes & cancer*. 2010;1(6):650-9.
49. Fletcher S, Prochownik EV. Small-molecule inhibitors of the Myc oncoprotein. *Biochimica et biophysica acta*. 2014.
50. Berg T, Cohen SB, Desharnais J, Sonderegger C, Maslyar DJ, Goldberg J, et al. Small-molecule antagonists of Myc/Max dimerization inhibit Myc-induced transformation of chicken embryo fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(6):3830-5.
51. Xu Y, Shi J, Yamamoto N, Moss JA, Vogt PK, Janda KD. A credit-card library approach for disrupting protein-protein interactions. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2006;14(8):2660-73.
52. Soucek L, Evan GI. The ups and downs of Myc biology. *Current opinion in genetics & development*. 2010;20(1):91-5.

53. Savino M, Annibali D, Carucci N, Favuzzi E, Cole MD, Evan GI, et al. The action mechanism of the Myc inhibitor termed Omomyc may give clues on how to target Myc for cancer therapy. *PloS one*. 2011;6(7):e22284.
54. Loven J, Hoke HA, Lin CY, Lau A, Orlando DA, Vakoc CR, et al. Selective inhibition of tumor oncogenes by disruption of super-enhancers. *Cell*. 2013;153(2):320-34.
55. Filippakopoulos P, Qi J, Picaud S, Shen Y, Smith WB, Fedorov O, et al. Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature*. 2010;468(7327):1067-73.
56. Fowler T, Ghatak P, Price DH, Conaway R, Conaway J, Chiang CM, et al. Regulation of MYC expression and differential JQ1 sensitivity in cancer cells. *PloS one*. 2014;9(1):e87003.
57. Hewings DS, Rooney TP, Jennings LE, Hay DA, Schofield CJ, Brennan PE, et al. Progress in the development and application of small molecule inhibitors of bromodomain-acetyl-lysine interactions. *Journal of medicinal chemistry*. 2012;55(22):9393-413.
58. Trabucco SE, Gerstein RM, Evens AM, Bradner JE, Shultz LD, Greiner DL, et al. Inhibition of bromodomain proteins for the treatment of human diffuse large B-cell lymphoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2014.
59. Filippakopoulos P, Knapp S. Targeting bromodomains: epigenetic readers of lysine acetylation. *Nature reviews Drug discovery*. 2014;13(5):337-56.
60. Filippakopoulos P, Picaud S, Fedorov O, Keller M, Wrobel M, Morgenstern O, et al. Benzodiazepines and benzotriazepines as protein interaction inhibitors targeting bromodomains of the BET family. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2012;20(6):1878-86.

61. Muller S, Filippakopoulos P, Knapp S. Bromodomains as therapeutic targets. *Expert reviews in molecular medicine*. 2011;13:e29.
62. Rahman S, Sowa ME, Ottinger M, Smith JA, Shi Y, Harper JW, et al. The Brd4 extraterminal domain confers transcription activation independent of pTEFb by recruiting multiple proteins, including NSD3. *Molecular and cellular biology*. 2011;31(13):2641-52.
63. Normant E, Cummings R, Bellon S, Bailey C, Albrecht B, Hewitt M, et al. Abstract LB-237: In vitro and in vivo characterization of CPI-267203, a potent Inhibitor of bromodomain-containing proteins. *AACR 103rd Annual Meeting 2012; April 15, 2012; Chicago, IL2012*.
64. Devaiah BN, Lewis BA, Cherman N, Hewitt MC, Albrecht BK, Robey PG, et al. BRD4 is an atypical kinase that phosphorylates serine2 of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(18):6927-32.
65. King B, Trimarchi T, Reavie L, Xu L, Mullenders J, Ntziachristos P, et al. The ubiquitin ligase FBXW7 modulates leukemia-initiating cell activity by regulating MYC stability. *Cell*. 2013;153(7):1552-66.
66. Shaffer AL, Emre NC, Lamy L, Ngo VN, Wright G, Xiao W, et al. IRF4 addiction in multiple myeloma. *Nature*. 2008;454(7201):226-31.
67. Shaffer AL, Emre NC, Romesser PB, Staudt LM. IRF4: Immunity. Malignancy! Therapy? *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15(9):2954-61.
68. Nutt SL, Taubenheim N, Hasbold J, Corcoran LM, Hodgkin PD. The genetic network controlling plasma cell differentiation. *Seminars in immunology*. 2011;23(5):341-9.
69. Shaffer AL, Rosenwald A, Staudt LM. Lymphoid malignancies: the dark side of B-cell differentiation. *Nature reviews Immunology*. 2002;2(12):920-32.

70. Shaughnessy JD. Cancer: An unexpected addiction. *Nature*. 2008;454(7201):172-3.
71. Bea S, Valdes-Mas R, Navarro A, Salaverria I, Martin-Garcia D, Jares P, et al. Landscape of somatic mutations and clonal evolution in mantle cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(45):18250-5.
72. Bea S, Salaverria I, Armengol L, Pinyol M, Fernandez V, Hartmann EM, et al. Uniparental disomies, homozygous deletions, amplifications, and target genes in mantle cell lymphoma revealed by integrative high-resolution whole-genome profiling. *Blood*. 2009;113(13):3059-69.
73. Hartmann EM, Campo E, Wright G, Lenz G, Salaverria I, Jares P, et al. Pathway discovery in mantle cell lymphoma by integrated analysis of high-resolution gene expression and copy number profiling. *Blood*. 2010;116(6):953-61.
74. Burger JA, Ford RJ. The microenvironment in mantle cell lymphoma: cellular and molecular pathways and emerging targeted therapies. *Seminars in cancer biology*. 2011;21(5):308-12.
75. Kurtova AV, Tamayo AT, Ford RJ, Burger JA. Mantle cell lymphoma cells express high levels of CXCR4, CXCR5, and VLA-4 (CD49d): importance for interactions with the stromal microenvironment and specific targeting. *Blood*. 2009;113(19):4604-13.
76. Medina DJ, Goodell L, Glod J, Gelinias C, Rabson AB, Strair RK. Mesenchymal stromal cells protect mantle cell lymphoma cells from spontaneous and drug-induced apoptosis through secretion of B-cell activating factor and activation of the canonical and non-canonical nuclear factor kappaB pathways. *Haematologica*. 2012;97(8):1255-63.
77. Cyster JG. B cell follicles and antigen encounters of the third kind. *Nature immunology*. 2010;11(11):989-96.

78. Lwin T, Lin J, Choi YS, Zhang X, Moscinski LC, Wright KL, et al. Follicular dendritic cell-dependent drug resistance of non-Hodgkin lymphoma involves cell adhesion-mediated Bim down-regulation through induction of microRNA-181a. *Blood*. 2010;116(24):5228-36.
79. Lwin T, Zhao X, Cheng F, Zhang X, Huang A, Shah B, et al. A microenvironment-mediated c-Myc/miR-548m/HDAC6 amplification loop in non-Hodgkin B cell lymphomas. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(11):4612-26.
80. Park CS, Choi YS. How do follicular dendritic cells interact intimately with B cells in the germinal centre? *Immunology*. 2005;114(1):2-10.
81. Porrata LF, Ristow K, Markovic SN. Absolute monocyte count at diagnosis and survival in mantle cell lymphoma. *British journal of haematology*. 2013;163(4):545-7.
82. Schrader C, Meusers P, Brittinger G, Janssen D, Teymoortash A, Siebmann JU, et al. Growth pattern and distribution of follicular dendritic cells in mantle cell lymphoma: a clinicopathological study of 96 patients. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2006;448(2):151-9.
83. von Hohenstaufen KA, Conconi A, de Campos CP, Zucca E. Prognostic impact of monocyte count at presentation in mantle cell lymphoma - response to George et al. *British journal of haematology*. 2014;164(6):893-4.
84. Cecconi D, Zamo A, Bianchi E, Parisi A, Barbi S, Milli A, et al. Signal transduction pathways of mantle cell lymphoma: a phosphoproteome-based study. *Proteomics*. 2008;8(21):4495-506.
85. Martinez N, Camacho FI, Algara P, Rodriguez A, Dopazo A, Ruiz-Ballesteros E, et al. The molecular signature of mantle cell lymphoma reveals multiple signals favoring cell survival. *Cancer research*. 2003;63(23):8226-32.

86. Pighi C, Gu TL, Dalai I, Barbi S, Parolini C, Bertolaso A, et al. Phospho-proteomic analysis of mantle cell lymphoma cells suggests a pro-survival role of B-cell receptor signaling. *Cellular oncology*. 2011;34(2):141-53.
87. Rinaldi A, Kwee I, Taborelli M, Largo C, Uccella S, Martin V, et al. Genomic and expression profiling identifies the B-cell associated tyrosine kinase Syk as a possible therapeutic target in mantle cell lymphoma. *British journal of haematology*. 2006;132(3):303-16.
88. Rizzatti EG, Falcao RP, Panepucci RA, Proto-Siqueira R, Anselmo-Lima WT, Okamoto OK, et al. Gene expression profiling of mantle cell lymphoma cells reveals aberrant expression of genes from the PI3K-AKT, WNT and TGFbeta signalling pathways. *British journal of haematology*. 2005;130(4):516-26.
89. Scott DW, Gascoyne RD. The tumour microenvironment in B cell lymphomas. *Nature reviews Cancer*. 2014;14(8):517-34.
90. Psyrrri A, Papageorgiou S, Liakata E, Scorilas A, Rontogianni D, Kontos CK, et al. Phosphatidylinositol 3'-kinase catalytic subunit alpha gene amplification contributes to the pathogenesis of mantle cell lymphoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15(18):5724-32.
91. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*. 1994;76(2):301-14.
92. Royo C, Salaverria I, Hartmann EM, Rosenwald A, Campo E, Bea S. The complex landscape of genetic alterations in mantle cell lymphoma. *Seminars in cancer biology*. 2011;21(5):322-34.
93. Witzig TE. Current treatment approaches for mantle-cell lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005;23(26):6409-14.



94. Njue A, Colosia A, Trask PC, Olivares R, Khan S, Abbe A, et al. Clinical Efficacy and Safety in Relapsed/Refractory Mantle Cell Lymphoma: A Systematic Literature Review. *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia*. 2014.
95. Robinson S, Dreger P, Caballero D, Corradini P, Geisler C, Ghielmini M, et al. The EBMT/EMCL consensus project on the role of autologous and allogeneic stem cell transplantation in mantle cell lymphoma. *Leukemia*. 2014.
96. Lenz G, Hiddemann W, Dreyling M. The role of fludarabine in the treatment of follicular and mantle cell lymphoma. *Cancer*. 2004;101(5):883-93.
97. Rummel MJ. Bendamustine in chronic lymphocytic leukemia and refractory lymphoma. *Seminars in hematology*. 2008;45(3 Suppl 2):S7-10.
98. Rummel MJ, Al-Batran SE, Kim SZ, Welslau M, Hecker R, Kofahl-Krause D, et al. Bendamustine plus rituximab is effective and has a favorable toxicity profile in the treatment of mantle cell and low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005;23(15):3383-9.
99. Yang Y, Kitagaki J, Wang H, Hou DX, Perantoni AO. Targeting the ubiquitin-proteasome system for cancer therapy. *Cancer science*. 2009;100(1):24-8.
100. Buac D, Shen M, Schmitt S, Kona FR, Deshmukh R, Zhang Z, et al. From bortezomib to other inhibitors of the proteasome and beyond. *Current pharmaceutical design*. 2013;19(22):4025-38.
101. FDA. FDA approves bortezomib (Velcade) for the treatment of patients with mantle cell lymphoma who have received at least one prior therapy [updated May 2009; cited 2014]. Available from: <http://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/OfficeofMedicalProductsandTobacco/CDER/ucm094929.htm>.

102. Fisher RI, Bernstein SH, Kahl BS, Djulbegovic B, Robertson MJ, de Vos S, et al. Multicenter phase II study of bortezomib in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006;24(30):4867-74.
103. Crawford LJ, Walker B, Irvine AE. Proteasome inhibitors in cancer therapy. *Journal of cell communication and signaling*. 2011;5(2):101-10.
104. Lopez-Guerra M, Colomer D. NF-kappaB as a therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2010;14(3):275-88.
105. Yang DT, Young KH, Kahl BS, Markovina S, Miyamoto S. Prevalence of bortezomib-resistant constitutive NF-kappaB activity in mantle cell lymphoma. *Molecular cancer*. 2008;7:40.
106. Perez-Galan P, Roue G, Villamor N, Campo E, Colomer D. The BH3-mimetic GX15-070 synergizes with bortezomib in mantle cell lymphoma by enhancing Noxa-mediated activation of Bak. *Blood*. 2007;109(10):4441-9.
107. Perez-Galan P, Roue G, Villamor N, Montserrat E, Campo E, Colomer D. The proteasome inhibitor bortezomib induces apoptosis in mantle-cell lymphoma through generation of ROS and Noxa activation independent of p53 status. *Blood*. 2006;107(1):257-64.
108. Xolalpa W, Perez-Galan P, Rodriguez MS, Roue G. Targeting the ubiquitin proteasome system: beyond proteasome inhibition. *Current pharmaceutical design*. 2013;19(22):4053-93.
109. Roue G, Perez-Galan P, Mozos A, Lopez-Guerra M, Xargay-Torrent S, Rosich L, et al. The Hsp90 inhibitor IPI-504 overcomes bortezomib resistance in mantle cell lymphoma in vitro and in vivo by down-regulation of the prosurvival ER chaperone BiP/Grp78. *Blood*. 2011;117(4):1270-9.

110. Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO reports*. 2006;7(9):880-5.
111. Weniger MA, Rizzatti EG, Perez-Galan P, Liu D, Wang Q, Munson PJ, et al. Treatment-induced oxidative stress and cellular antioxidant capacity determine response to bortezomib in mantle cell lymphoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2011;17(15):5101-12.
112. Perez-Galan P, Mora-Jensen H, Weniger MA, Shaffer AL, 3rd, Rizzatti EG, Chapman CM, et al. Bortezomib resistance in mantle cell lymphoma is associated with plasmacytic differentiation. *Blood*. 2011;117(2):542-52.
113. Shaffer AL, Lin KI, Kuo TC, Yu X, Hurt EM, Rosenwald A, et al. Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity*. 2002;17(1):51-62.
114. Berchtold CM, Chen KS, Miyamoto S, Gould MN. Perillyl alcohol inhibits a calcium-dependent constitutive nuclear factor-kappaB pathway. *Cancer research*. 2005;65(18):8558-66.
115. Jung HJ, Chen Z, Wang M, Fayad L, Romaguera J, Kwak LW, et al. Calcium blockers decrease the bortezomib resistance in mantle cell lymphoma via manipulation of tissue transglutaminase activities. *Blood*. 2012;119(11):2568-78.
116. Yeruva L, Hall C, Elegbede JA, Carper SW. Perillyl alcohol and methyl jasmonate sensitize cancer cells to cisplatin. *Anti-cancer drugs*. 2010;21(1):1-9.
117. Fruman DA, Rommel C. PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities. *Nature reviews Drug discovery*. 2014;13(2):140-56.

118. Muller A, Zang C, Chumduri C, Dorken B, Daniel PT, Scholz CW. Concurrent inhibition of PI3K and mTORC1/mTORC2 overcomes resistance to rapamycin induced apoptosis by down-regulation of Mcl-1 in mantle cell lymphoma. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2013;133(8):1813-24.
119. Coiffier B. Clinical efficacy and management of temsirolimus in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia*. 2013;13(4):351-9.
120. Bouabdallah K, Ribrag V, Terriou L, Soria JC, Delarue R. Temsirolimus in the treatment of mantle cell lymphoma: frequency and management of adverse effects. *Current opinion in oncology*. 2013;25 Suppl 2:S1-12.
121. EMA. Torisel. Temsirolimus [updated Dec 2013; cited 2014]. Available from: [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000799/human\\_med\\_001098.jsp&mid=WC0b01ac058001d124](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000799/human_med_001098.jsp&mid=WC0b01ac058001d124).
122. Hess G, Herbrecht R, Romaguera J, Verhoef G, Crump M, Gisselbrecht C, et al. Phase III study to evaluate temsirolimus compared with investigator's choice therapy for the treatment of relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(23):3822-9.
123. Desai M, Newberry K, Ou Z, Wang M, Zhang L. Lenalidomide in relapsed or refractory mantle cell lymphoma: overview and perspective. *Therapeutic advances in hematology*. 2014;5(3):91-101.
124. FDA. Approved Drugs: lenalidomide [updated June 2013; cited 2014]. Available from: <http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm355438.htm>.

125. Goy A, Sinha R, Williams ME, Kalayoglu Besisik S, Drach J, Ramchandren R, et al. Single-agent lenalidomide in patients with mantle-cell lymphoma who relapsed or progressed after or were refractory to bortezomib: phase II MCL-001 (EMERGE) study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(29):3688-95.
126. Woyach JA, Johnson AJ, Byrd JC. The B-cell receptor signaling pathway as a therapeutic target in CLL. *Blood*. 2012;120(6):1175-84.
127. Ibrutinib approved for mantle cell lymphoma. *Cancer discovery*. 2014;4(1):OF1.
128. Cameron F, Sanford M. Ibrutinib: first global approval. *Drugs*. 2014;74(2):263-71.
129. Wang ML, Rule S, Martin P, Goy A, Auer R, Kahl BS, et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed or refractory mantle-cell lymphoma. *The New England journal of medicine*. 2013;369(6):507-16.
130. FDA. Approved Drugs: Ibrutinib [updated Nov 2013; cited 2014]. Available from: <http://www.fda.gov/drugs/informationondrugs/approveddrugs/ucm374857.htm>.
131. Shortt J, Hsu AK, Johnstone RW. Thalidomide-analogue biology: immunological, molecular and epigenetic targets in cancer therapy. *Oncogene*. 2013;32(36):4191-202.
132. Pan B, Lentzsch S. The application and biology of immunomodulatory drugs (IMiDs) in cancer. *Pharmacology & therapeutics*. 2012;136(1):56-68.
133. Wemeau M, Gauthier J, Leleu X, Yakoub-Agha I. [IMiDs in hematology]. *Bulletin du cancer*. 2011;98(8):879-87.

134. Raje N, Anderson K. Thalidomide--a revival story. *The New England journal of medicine*. 1999;341(21):1606-9.
135. Suppiah R, Srkalovic JG, Hussein MA. Immunomodulatory analogues of thalidomide in the treatment of multiple myeloma. *Clinical lymphoma & myeloma*. 2006;6(4):301-5.
136. Jurczyszyn A, Legiec W, Helbig G, Hus M, Kyrzcz-Krzemien S, Skotnicki AB. New drugs in multiple myeloma - role of carfilzomib and pomalidomide. *Contemporary oncology*. 2014;18(1):17-21.
137. Lacy MQ, McCurdy AR. Pomalidomide. *Blood*. 2013;122(14):2305-9.
138. Castelli R, Cassin R, Cannavo A, Cugno M. Immunomodulatory drugs: new options for the treatment of myelodysplastic syndromes. *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia*. 2013;13(1):1-7.
139. Kotla V, Goel S, Nischal S, Heuck C, Vivek K, Das B, et al. Mechanism of action of lenalidomide in hematological malignancies. *Journal of hematology & oncology*. 2009;2:36.
140. Prince HM, Mileskin L, Roberts A, Ganju V, Underhill C, Catalano J, et al. A multicenter phase II trial of thalidomide and celecoxib for patients with relapsed and refractory multiple myeloma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11(15):5504-14.
141. LeBlanc R, Hideshima T, Catley LP, Shringarpure R, Burger R, Mitsiades N, et al. Immunomodulatory drug costimulates T cells via the B7-CD28 pathway. *Blood*. 2004;103(5):1787-90.
142. McDaniel JM, Pinilla-Ibarz J, Epling-Burnette PK. Molecular action of lenalidomide in lymphocytes and hematologic malignancies. *Advances in hematology*. 2012;2012:513702.

143. Davies FE, Raje N, Hideshima T, Lentzsch S, Young G, Tai YT, et al. Thalidomide and immunomodulatory derivatives augment natural killer cell cytotoxicity in multiple myeloma. *Blood*. 2001;98(1):210-6.
144. Lopez-Girona A, Heintel D, Zhang LH, Mendy D, Gaidarova S, Brady H, et al. Lenalidomide downregulates the cell survival factor, interferon regulatory factor-4, providing a potential mechanistic link for predicting response. *British journal of haematology*. 2011;154(3):325-36.
145. Zhu YX, Braggio E, Shi CX, Bruins LA, Schmidt JE, Van Wier S, et al. Cereblon expression is required for the antimyeloma activity of lenalidomide and pomalidomide. *Blood*. 2011;118(18):4771-9.
146. Huang SY, Lin CW, Lin HH, Yao M, Tang JL, Wu SJ, et al. Expression of cereblon protein assessed by immunohistochemical staining in myeloma cells is associated with superior response of thalidomide- and lenalidomide-based treatment, but not bortezomib-based treatment, in patients with multiple myeloma. *Annals of hematology*. 2014;93(8):1371-80.
147. Zhu YX, Braggio E, Shi CX, Kortuem KM, Bruins LA, Schmidt JE, et al. Identification of cereblon-binding proteins and relationship with response and survival after IMiDs in multiple myeloma. *Blood*. 2014;124(4):536-45.
148. Lu G, Middleton RE, Sun H, Naniong M, Ott CJ, Mitsiades CS, et al. The myeloma drug lenalidomide promotes the cereblon-dependent destruction of Ikaros proteins. *Science*. 2014;343(6168):305-9.
149. Yang Y, Shaffer AL, 3rd, Emre NC, Ceribelli M, Zhang M, Wright G, et al. Exploiting synthetic lethality for the therapy of ABC diffuse large B cell lymphoma. *Cancer cell*. 2012;21(6):723-37.
150. Zhang LH, Kosek J, Wang M, Heise C, Schafer PH, Chopra R. Lenalidomide efficacy in activated B-cell-like subtype diffuse large B-cell lymphoma is dependent upon IRF4 and cereblon expression. *British journal of haematology*. 2013;160(4):487-502.

151. Fecteau JF, Corral LG, Ghia EM, Gaidarova S, Futalan D, Bharati IS, et al. Lenalidomide inhibits the proliferation of chronic lymphocytic leukemia cells via a cereblon/p21WAF1/Cip1-dependent mechanism independent of functional p53. *Blood*. 2014.
152. Mitsiades N, Mitsiades CS, Poulaki V, Chauhan D, Richardson PG, Hideshima T, et al. Apoptotic signaling induced by immunomodulatory thalidomide analogs in human multiple myeloma cells: therapeutic implications. *Blood*. 2002;99(12):4525-30.
153. Zangari M, Elice F, Tricot G. Immunomodulatory drugs in multiple myeloma. *Expert opinion on investigational drugs*. 2005;14(11):1411-8.
154. Zhang L, Qian Z, Cai Z, Sun L, Wang H, Bartlett JB, et al. Synergistic antitumor effects of lenalidomide and rituximab on mantle cell lymphoma in vitro and in vivo. *American journal of hematology*. 2009;84(9):553-9.
155. Wang M, Fayad L, Wagner-Bartak N, Zhang L, Hagemester F, Neelapu SS, et al. Lenalidomide in combination with rituximab for patients with relapsed or refractory mantle-cell lymphoma: a phase 1/2 clinical trial. *The lancet oncology*. 2012;13(7):716-23.
156. Qian Z, Zhang L, Cai Z, Sun L, Wang H, Yi Q, et al. Lenalidomide synergizes with dexamethasone to induce growth arrest and apoptosis of mantle cell lymphoma cells in vitro and in vivo. *Leukemia research*. 2011;35(3):380-6.
157. Zaja F, De Luca S, Vitolo U, Orsucci L, Levis A, Salvi F, et al. Salvage treatment with lenalidomide and dexamethasone in relapsed/refractory mantle cell lymphoma: clinical results and effects on microenvironment and neo-angiogenic biomarkers. *Haematologica*. 2012;97(3):416-22.
158. Ahmadi T, Chong EA, Gordon A, Aqui NA, Nasta SD, Svoboda J, et al. Combined lenalidomide, low-dose dexamethasone, and rituximab



- achieves durable responses in rituximab-resistant indolent and mantle cell lymphomas. *Cancer*. 2014;120(2):222-8.
159. Morrison VA, Jung SH, Johnson J, LaCasce A, Blum KA, Bartlett NL, et al. Therapy with bortezomib plus lenalidomide for relapsed/refractory mantle cell lymphoma: Final results of a phase II trial (CALGB 50501). *Leukemia & lymphoma*. 2014;1-14.
160. Humala K, Younes A. Current and emerging new treatment strategies for mantle cell lymphoma. *Leukemia & lymphoma*. 2013;54(5):912-21.
161. Zinzani PL, Vose JM, Czuczman MS, Reeder CB, Haioun C, Polikoff J, et al. Long-term follow-up of lenalidomide in relapsed/refractory mantle cell lymphoma: subset analysis of the NHL-003 study. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2013;24(11):2892-7.
162. Tajeja N. Lenalidomide - current understanding of mechanistic properties. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*. 2011;11(3):315-26.
163. Zhu YX, Kortuem KM, Stewart AK. Molecular mechanism of action of immune-modulatory drugs thalidomide, lenalidomide and pomalidomide in multiple myeloma. *Leukemia & lymphoma*. 2013;54(4):683-7.
164. Chiarle R, Budel LM, Skolnik J, Frizzera G, Chilosi M, Corato A, et al. Increased proteasome degradation of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 is associated with a decreased overall survival in mantle cell lymphoma. *Blood*. 2000;95(2):619-26.
165. Letestu R, Ugo V, Valensi F, Radford-Weiss I, Nataf J, Levy V, et al. Prognostic impact of p27KIP1 expression in cyclin D1 positive lymphoproliferative disorders. *Leukemia*. 2004;18(5):953-61.

166. Cai K, Dynlacht BD. Activity and nature of p21(WAF1) complexes during the cell cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(21):12254-9.
167. Cheng M, Sexl V, Sherr CJ, Roussel MF. Assembly of cyclin D-dependent kinase and titration of p27Kip1 regulated by mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(3):1091-6.
168. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & development*. 1999;13(12):1501-12.
169. Sanchez-Beato M, Camacho FI, Martinez-Montero JC, Saez AI, Villuendas R, Sanchez-Verde L, et al. Anomalous high p27/KIP1 expression in a subset of aggressive B-cell lymphomas is associated with cyclin D3 overexpression. p27/KIP1-cyclin D3 colocalization in tumor cells. *Blood*. 1999;94(2):765-72.
170. Kotoshiba S, Kamura T, Hara T, Ishida N, Nakayama KI. Molecular dissection of the interaction between p27 and Kip1 ubiquitylation-promoting complex, the ubiquitin ligase that regulates proteolysis of p27 in G1 phase. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(18):17694-700.
171. Tchakarska G, Roussel M, Troussard X, Sola B. Cyclin D1 inhibits mitochondrial activity in B cells. *Cancer research*. 2011;71(5):1690-9.
172. Feng Q, Sekula D, Muller R, Freemantle SJ, Dmitrovsky E. Uncovering residues that regulate cyclin D1 proteasomal degradation. *Oncogene*. 2007;26(35):5098-106.
173. Chiarle R, Fan Y, Piva R, Boggino H, Skolnik J, Novero D, et al. S-phase kinase-associated protein 2 expression in non-Hodgkin's lymphoma inversely correlates with p27 expression and defines cells in S phase. *The American journal of pathology*. 2002;160(4):1457-66.

174. Lim MS, Adamson A, Lin Z, Perez-Ordóñez B, Jordan RC, Tripp S, et al. Expression of Skp2, a p27(Kip1) ubiquitin ligase, in malignant lymphoma: correlation with p27(Kip1) and proliferation index. *Blood*. 2002;100(8):2950-6.
175. Bretones G, Acosta JC, Caraballo JM, Ferrandiz N, Gomez-Casares MT, Albajar M, et al. SKP2 oncogene is a direct MYC target gene and MYC down-regulates p27(KIP1) through SKP2 in human leukemia cells. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(11):9815-25.
176. Pinyol M, Hernandez L, Cazorla M, Balbin M, Jares P, Fernandez PL, et al. Deletions and loss of expression of p16INK4a and p21Waf1 genes are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas. *Blood*. 1997;89(1):272-80.
177. Jardin F, Picquenot JM, Parmentier F, Ruminy P, Cornic M, Penther D, et al. Detection of gene copy number aberrations in mantle cell lymphoma by a single quantitative multiplex PCR assay: clinicopathological relevance and prognosis value. *British journal of haematology*. 2009;146(6):607-18.
178. Besson A, Dowdy SF, Roberts JM. CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Developmental cell*. 2008;14(2):159-69.
179. Belletti B, Pellizzari I, Berton S, Fabris L, Wolf K, Lovat F, et al. p27kip1 controls cell morphology and motility by regulating microtubule-dependent lipid raft recycling. *Molecular and cellular biology*. 2010;30(9):2229-40.
180. Oerlemans R, Franke NE, Assaraf YG, Cloos J, van Zantwijk I, Berkers CR, et al. Molecular basis of bortezomib resistance: proteasome subunit beta5 (PSMB5) gene mutation and overexpression of PSMB5 protein. *Blood*. 2008;112(6):2489-99.
181. Ruckrich T, Kraus M, Gogel J, Beck A, Ovaas H, Verdoes M, et al. Characterization of the ubiquitin-proteasome system in bortezomib-adapted cells. *Leukemia*. 2009;23(6):1098-105.

182. Mittrucker HW, Matsuyama T, Grossman A, Kundig TM, Potter J, Shahinian A, et al. Requirement for the transcription factor LSIRF/IRF4 for mature B and T lymphocyte function. *Science*. 1997;275(5299):540-3.
183. Klein U, Casola S, Cattoretti G, Shen Q, Lia M, Mo T, et al. Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. *Nature immunology*. 2006;7(7):773-82.
184. Ma S, Turetsky A, Trinh L, Lu R. IFN regulatory factor 4 and 8 promote Ig light chain kappa locus activation in pre-B cell development. *Journal of immunology*. 2006;177(11):7898-904.
185. Sciammas R, Shaffer AL, Schatz JH, Zhao H, Staudt LM, Singh H. Graded expression of interferon regulatory factor-4 coordinates isotype switching with plasma cell differentiation. *Immunity*. 2006;25(2):225-36.
186. Camacho FI, Algara P, Rodriguez A, Ruiz-Ballesteros E, Mollejo M, Martinez N, et al. Molecular heterogeneity in MCL defined by the use of specific VH genes and the frequency of somatic mutations. *Blood*. 2003;101(10):4042-6.
187. Kienle D, Krober A, Katzenberger T, Ott G, Leupolt E, Barth TF, et al. VH mutation status and VDJ rearrangement structure in mantle cell lymphoma: correlation with genomic aberrations, clinical characteristics, and outcome. *Blood*. 2003;102(8):3003-9.
188. Orchard J, Garand R, Davis Z, Babbage G, Sahota S, Matutes E, et al. A subset of t(11;14) lymphoma with mantle cell features displays mutated IgVH genes and includes patients with good prognosis, nonnodal disease. *Blood*. 2003;101(12):4975-81.
189. Naushad H, Choi WW, Page CJ, Sanger WG, Weisenburger DD, Aoun P. Mantle cell lymphoma with flow cytometric evidence of clonal plasmacytic differentiation: a case report. *Cytometry Part B, Clinical cytometry*. 2009;76(3):218-24.

190. Young KH, Chan WC, Fu K, Iqbal J, Sanger WG, Ratashak A, et al. Mantle cell lymphoma with plasma cell differentiation. *The American journal of surgical pathology*. 2006;30(8):954-61.
191. Richardson PG, Sonneveld P, Schuster MW, Irwin D, Stadtmauer EA, Facon T, et al. Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *The New England journal of medicine*. 2005;352(24):2487-98.
192. Reece DE, Sanchorawala V, Hegenbart U, Merlini G, Palladini G, Fermand JP, et al. Weekly and twice-weekly bortezomib in patients with systemic AL amyloidosis: results of a phase 1 dose-escalation study. *Blood*. 2009;114(8):1489-97.
193. Meister S, Schubert U, Neubert K, Herrmann K, Burger R, Gramatzki M, et al. Extensive immunoglobulin production sensitizes myeloma cells for proteasome inhibition. *Cancer research*. 2007;67(4):1783-92.
194. Aukema SM, Siebert R, Schuurin E, van Imhoff GW, Kluijn-Nelemans HC, Boerma EJ, et al. Double-hit B-cell lymphomas. *Blood*. 2011;117(8):2319-31.
195. Setoodeh R, Schwartz S, Papenhausen P, Zhang L, Sagatys EM, Moscinski LC, et al. Double-hit mantle cell lymphoma with MYC gene rearrangement or amplification: a report of four cases and review of the literature. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2013;6(2):155-67.
196. Gandhi AK, Mendy D, Waldman M, Chen G, Rychak E, Miller K, et al. Measuring cereblon as a biomarker of response or resistance to lenalidomide and pomalidomide requires use of standardized reagents and understanding of gene complexity. *British journal of haematology*. 2014;164(2):233-44.

197. Bridge AJ, Pebernard S, Ducraux A, Nicoulaz AL, Iggo R. Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nature genetics*. 2003;34(3):263-4.
198. Dib A, Gabrea A, Glebov OK, Bergsagel PL, Kuehl WM. Characterization of MYC translocations in multiple myeloma cell lines. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*. 2008(39):25-31.
199. Clausen DM, Guo J, Parise RA, Beumer JH, Egorin MJ, Lazo JS, et al. In vitro cytotoxicity and in vivo efficacy, pharmacokinetics, and metabolism of 10074-G5, a novel small-molecule inhibitor of c-Myc/Max dimerization. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2010;335(3):715-27.
200. Delmore JE, Issa GC, Lemieux ME, Rahl PB, Shi J, Jacobs HM, et al. BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. *Cell*. 2011;146(6):904-17.
201. Mertz JA, Conery AR, Bryant BM, Sandy P, Balasubramanian S, Mele DA, et al. Targeting MYC dependence in cancer by inhibiting BET bromodomains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(40):16669-74.
202. Cheng Z, Gong Y, Ma Y, Lu K, Lu X, Pierce LA, et al. Inhibition of BET bromodomain targets genetically diverse glioblastoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2013;19(7):1748-59.
203. Goupille O, Penglong T, Lefevre C, Granger M, Kadri Z, Fucharoen S, et al. BET bromodomain inhibition rescues erythropoietin differentiation of human erythroleukemia cell line UT7. *Biochemical and biophysical research communications*. 2012;429(1-2):1-5.

204. Ott CJ, Kopp N, Bird L, Paranal RM, Qi J, Bowman T, et al. BET bromodomain inhibition targets both c-Myc and IL7R in high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2012;120(14):2843-52.
205. Zhao X, Lwin T, Zhang X, Huang A, Wang J, Marquez VE, et al. Disruption of the MYC-miRNA-EZH2 loop to suppress aggressive B-cell lymphoma survival and clonogenicity. *Leukemia*. 2013;27(12):2341-50.

ANNEXOS





## Annex 1. Presentacions en congressos derivades d'aquesta tesi

### Conferències

1. Conferenciant convidat: *Targeting the IRF4/MYC axis with lenalidomide in bortezomib-resistant Mantle Cell Lymphoma*  
13th annual European MCL Network meeting, 2013; Dubrovnik, Croàcia

### Pòsters

1. *Activity of lenalidomide in in vitro and in vivo models of bortezomib-resistant mantle cell lymphoma involving the modulation of c-Myc/p27 axis*  
AACR Annual Meeting (American Association for Cancer Research), 2012; Chicago, IL, EEUU
2. *Activity of lenalidomide in in vitro and in vivo models of bortezomib-resistant mantle cell lymphoma involving the modulation of c-Myc/p27 axis*  
EACR-22 - from Basic Research to Personalised Cancer Treatment (European Association for Cancer Research), 2012; Barcelona, Espanya
3. *Activity of lenalidomide in in vitro and in vivo models of bortezomib-resistant mantle cell lymphoma involving the modulation of c-Myc/p27 axis*  
III Encuentro jóvenes investigadores RTICC, 2012; Barcelona, Espanya
4. *Synergistic anti-tumor activity of lenalidomide with the BET bromodomain inhibitor CPI203 in bortezomib-resistant mantle cell lymphoma*  
10th International Symposium of Translational Oncology, 2014; Barcelona, Espanya  
→ Menció especial: pòster guardonat amb el primer premi en el concurs científic de pòsters

5. *Synergistic anti-tumor activity of lenalidomide with the BET bromodomain inhibitor CPI203 in bortezomib-resistant mantle cell lymphoma*  
AACR Annual Meeting (American Association for Cancer Research),  
2014; San Diego, CA, EEUU

## Annex 2: Altres publicacions en col·laboració

Vegliante MC, Palomero J, Pérez-Galán P, Roué G, Castellano G, Navarro A, Clot G, Moros A, Suárez-Cisneros H, Beà S, Hernández L, Enjuanes A, Jares P, Villamor N, Colomer D, Martín-Subero JI, Campo E, Amador V.

**SOX11 regulates PAX5 expression and blocks terminal B-cell differentiation in aggressive mantle cell lymphoma.**

*SOX11 regula l'expressió de PAX5 i bloqueja la diferenciació terminal de la cèl·lula B en limfomes de cèl·lules del mantell agressius.*

*Blood.* 2013 Mar 21;121(12):2175-85. doi: 10.1182/blood-2012-06-438937.

### RESUM

El limfoma de cèl·lules del mantell (MCL) és un dels limfomes més agressius la patogènesi del qual no és ben coneguda. El factor de transcripció neural SOX11 està sobreexpressat en la majoria dels MCL però no es detecta en altres limfomes de cèl·lula B madura o en cèl·lules limfoides normals. L'expressió específica de SOX11 en el MCL suggereix que pot ser un element important en el desenvolupament d'aquest tumor, però la seva funció potencial no és coneix. En aquest treball, es mostra que SOX11 promou el creixement tumoral en models de xenotrasplantament de MCL en ratolí. Fent servir l'anàlisi del *microarray* de la immunoprecipitació de la cromatina combinada amb el perfil d'expressió gènica del *knockdown* de SOX11, s'han identificat gens diana i programes transcripcionals regulats per SOX11 inclosos el bloqueig de la diferenciació de cèl·lules B madures, la modulació del cicle cel·lular, l'apoptosi, i el desenvolupament de cèl·lules mare. PAX5 sorgeix com una de les principals dianes directes de SOX11. El silenciament

de SOX11 disminueix PAX5, indueix l'expressió de BLIMP1, i promou el canvi de cèl·lula B madura al fenotip inicial de diferenciació plasmocítica tant en cèl·lules primàries de tumors com en models *in vitro*. Els nostres resultats suggereixen que SOX11 contribueix al desenvolupament tumoral alterant el programa terminal del MCL de diferenciació de cèl·lula B i proporciona perspectives que poden tenir implicacions clíniques en el diagnòstic i disseny de noves estratègies terapèutiques.

Reis-Sobreiro M, Roué G, Moros A, Gajate C, de la Iglesia-Vicente J, Colomer D, Mollinedo F.

**Lipid raft-mediated Akt signaling as a therapeutic target in mantle cell lymphoma.**

*La senyalització de bales lipídiques intervinguda per Akt com a diana terapèutica en el limfoma de cèl·lules del mantell.*

*Blood Cancer J. 2013 May 31;3:e118. doi: 10.1038/bcj.2013.15.*

RESUM

Les evidències recents mostren que els dominis de membrana anomenats bales lipídiques modulen tant la supervivència cel·lular com la mort. En aquest estudi, hem trobat que la via de senyalització fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K)/Akt està present a les bales lipídiques en el limfoma de cèl·lules del mantell (MCL), i aquesta localització sembla ser crítica per la completa activació i la supervivència cel·lular del MCL. Els lípids antitumorals (*ATL, antitumor lipids*) edelfosina i perifosina tenen com a diana les bales, i hem trobat que tenen activitat antitumoral *in vitro* i *in vivo* contra les cèl·lules de MCL desplaçant Akt i les cinases reguladores p-PDK1 (*phosphatidylinositol-dependent protein kinase 1*), PI3K i mTOR (*mammalian TOR*) de les bales lipídiques. Aquesta reorganització de les bales porten a la desfosforilació d'Akt, mentre que el receptor de mort proapoptòtic Fas/CD95 és reclutat a les bales. La integritat de les bales és crítica per la fosforilació d'Akt en la Ser473. L'apoptosi induïda per ATL sembla que correlaciona l'estatus de fosforilació basal d'Akt en les línies cel·lulars de MCL i en cultius primaris, i pot ser potenciat per l'inhibidor de PI3K wortmannina, o inhibida per l'activador d'Akt pervanadat. Els inhibidors clàssics d'Akt indueixen apoptosi en cèl·lules de MCL. L'estímul del microambient, com la unió de

CD40 o el contacte de les cèl·lules estromals, no prevenen de l'apoptosi induïda per ATL en línies cel·lulars o en cèl·lules derivades de pacients de MCL. Aquests resultats ressalten el rol de la senyalització PI3K/Akt intervinguda per les bales lipídiques en la supervivència cel·lular en el MCL i en la quimioteràpia, sent una nova diana pel tractament del MCL.

Sánchez-Tilló E, Fanlo L, Siles L, Montes-Moreno S, Moros A, Chiva-Blanch G, Estruch R, Martínez A, Colomer D, Gyórfy B, Roué G, Postigo A.

**The EMT activator ZEB1 promotes tumor growth and determines differential response to chemotherapy in mantle cell lymphoma.**

*L'activador d'EMT ZEB1 promou el creixement tumoral i determina la resposta diferencial a la quimioteràpia en limfoma de cèl·lules del mantell.*

*Cell Death Differ.* 2014 Feb;21(2):247-57. doi: 10.1038/cdd.2013.123.

## RESUM

El limfoma de cèl·lules del mantell (MCL) és una neoplàsia maligna de cèl·lula B caracteritzada per una pobra resposta al tractament i un pobre pronòstic. L'activació constitutiva de diferents vies de senyalització en subconjunts de MCL, a través d'alteracions genètiques o no genètiques, dota a les cèl·lules tumorals d'una proliferació incrementada i una apoptosi reduïda. La via canònica de la via Wnt ( $\beta$ -catenina/TCF-LEF), implicada en la patogènesi d'un gran nombre de càncers, està constitutivament activa en la meitat dels casos de MCL. En aquest estudi, mostrem que ZEB1, un factor de transcripció millor conegut per promoure metàstasi en carcinomes, està expressat en MCL primaris amb la senyalització per Wnt activa. L'expressió de ZEB1 en cèl·lules de MCL depèn de Wnt, sent disminuït pel *knockdown* de la  $\beta$ -catenina o pel bloqueig de la senyalització de la via Wnt amb salinomicina. El *knockdown* de ZEB1 redueix la viabilitat i la proliferació de les cèl·lules de MCL *in vitro*, i de forma important, el creixement tumoral en models de xenotrasplantament de ratolí. ZEB1 activa gens associats a la proliferació (*HMGB2*, *UHRF1*, *CENPF*, *MYC*, *MKI67* i *CCND1*) i gens antiapoptòtics (*MCL1*, *BCL2* i *BIRC5*) i inhibeix els gens proapoptòtics (*TP53*, *BBC3*, *PMAIP1* i *BAX*). Hem mostrat que l'expressió de ZEB1 en cèl·lules de



MCL determina la resistència diferencial a fàrmacs quimioteràpics i regula els transportadors involucrats en la importació i exportació de fàrmacs. La disminució de ZEB1 amb salinomicina incrementa la sensibilitat de les cèl·lules de MCL a l'efecte citotòxic de la doxorubicina, la citarabina i la gemcitabina. Per últim, la salinomicina i la doxorubicina mostren un efecte sinèrgic en cèl·lules primàries i establertes de MCL. Aquests resultats identifiquen ZEB1 en el MCL, on promou la proliferació cel·lular, l'increment del creixement tumoral i una resposta diferencial als fàrmacs quimioteràpics. ZEB1 podria ser un potencial biomarcador predictiu i una diana terapèutica en aquest limfoma.

Beà S, Valdés-Mas R, Navarro A, Salaverria I, Martín-García D, Jares P, Giné E, Pinyol M, Royo C, Nadeu F, Conde L, Juan M, Clot G, Vizán P, Di Croce L, Puente DA, López-Guerra M, Moros A, Roue G, Aymerich M, Villamor N, Colomo L, Martínez A, Valera A, Martín-Subero JI, Amador V, Hernández L, Rozman M, Enjuanes A, Forcada P, Muntañola A, Hartmann EM, Calasanz MJ, Rosenwald A, Ott G, Hernández-Rivas JM, Klapper W, Siebert R, Wiestner A, Wilson WH, Colomer D, López-Guillermo A, López-Otín C, Puente XS, Campo E.

**Landscape of somatic mutations and clonal evolution in mantle cell lymphoma.**

*Panorama de les mutacions somàtiques i l'evolució clonal en el limfoma de cèl·lules del mantell.*

*Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Nov 5;110(45):18250-5. doi: 10.1073/pnas.1314608110.*

RESUM

El limfoma de cèl·lules del mantell (MCL) és un tumor agressiu, però un subconjunt de pacients mostren un curs clínic indolent. Per entendre els mecanismes sota aquesta heterogeneïtat biològica, hem portat a terme la seqüenciació del total del genoma i/o dels exomes de 29 casos de MCL i dels seus respectius DNA normals, així com de 6 línies cel·lulars de MCL. Recurrentment els gens mutats van ser investigats per *targeted sequencing* en una cohort independent de 172 casos de pacients de MCL. Vam identificar 25 mutacions de gens significatives, incloent-hi *drivers* coneguts com l'*ataxia-telangectasia mutated (ATM)*, la ciclina D1 (*CCND1*), i el supressor de tumors *TP53*; gens mutats que codifiquen per la proteïna antiapoptòtica *BIRC3* i el receptor *Toll-like 2 (TLR2)*; i els modificadors de la cromatina *WHSC1*, *MLL2*

i MEF2B. També vam trobar mutacions en *NOTCH2* com un fenomen alternatiu a les mutacions de *NOTCH1* en tumors agressius amb pobre pronòstic. L'anàlisi de dues mostres de MCL simultànies o subseqüents per seqüenciació *whole-genome/whole-exome* (n = 8) o *targeted* (n = 19) va revelar heterogeneïtat subclonal en el diagnòstic a mostres de diferents procedències topogràfiques i modulació del perfil mutacional inicial en la progressió de la malaltia. Algunes mutacions van ser predominantment clonals o subclonals, indicant un esdeveniment temprà o tardà en l'evolució del tumor, respectivament. El nostre estudi identifica mecanismes moleculars contribuent a la patogènesi del MCL i ofereix potencials dianes per la intervenció terapèutica.

# AGRAÏMENTS



D'ençà que vaig començar la tesi ja han passat gairebé quatre anys. Quatre anys en què he après moltíssim, he conegut gent genial que espero seguir tenint al meu costat, he pogut conèixer món i fer contactes i m'he adonat que és a la ciència al que em vull seguir dedicant també en el futur. És ara, quan m'assec i penso en la feina d'aquests 4 anys, quan me n'adono que a canvi d'haver treballat amb moltes ganes m'emporto una molt bona recompensa.

És evident que tot això no ho hauria pogut fer sola, (i sort, perquè amb el que xerro hauria estat molt avorrit!). Ara és l'hora del moment dolç de la tesi: el de donar les gràcies a tots els que m'heu acompanyat en aquest camí.

En primer lloc, et volia agrair a tu, Gaël, tot aquest temps que hem dedicat junts a què això tinguéssis sentit. Quantes coses que m'has ensenyat!, això m'ho enduc amb mi allà on em porti el destí. Volia agrair-te el teu esperit optimista (que contraresta la meua visió més escèptica), la teua capacitat per veure figures allà on jo només veia dades inconnexes i el fet que t'hagis involucrat tant per tal que tot anés prenent un sentit. A escala professional només puc donar-te les gràcies, però també te les volia donar en l'àmbit personal, perquè aquests anys de tesi han estat súper productius, m'he sentit molt realitzada i realment sé que sóc molt afortunada per haver escollit aquest grup on fer la tesi. Sóc l'enveja de les meves amigues científiques!

Òbviament, la Dolors mereix una menció especial en aquestes pàgines: gràcies a tu aquest grup, que cada cop es fa més gran, segueix investigant sota el mateix fil conductor i segueix cultivant bons resultats que són publicats en grans revistes.

Volia donar les gràcies a la Patri P: sempre m'has donat bones idees i has estat disponible per resoldre els meus dubtes. Qui sap si algun dia ens retrobarem a l'AVE...

Afegeixo una menció especial pel Dr. Elías Campo, per les seves revisions crítiques en els nostres articles.

De la mateixa manera, també agrair el treball de l'àmbit de la patologia dut a terme pel Toni, necessari per la bona categorització de les mostres emprades en els articles.

Gràcies també a tot el "grup Dolors": la Mònica, la Sílvia, l'Arnau, l'Eriang, i també a les noies, la Jocabed, la Laura i la Sandra, perquè anar al laboratori es fa més amè quan saps que estàs ben acompanyada (encara que hagi de lluitar per una campana!). Fa molta il·lusió quan arriba el Nadal i el primer que fas en arribar al *lab* és obrir el calaix i trobar una pista!

A totes les meves nenes... què més puc dir que un "gràcies" ben fort. Gràcies a la Vani, la Marti (ets la filla adoptiva del grup limfoma), l'Anna, l'Alba, la Clara, la Carla, la Patri B i la Martina. Mai havia tingut tan bon rollo a cap altra feina, i òbviament, això repercuteix en les ganes de treballar. Gràcies!

També els meus millors desitjos pel grup "difús": Iván i Laura, us desitjo el millor, ja sigui a la recerca o a la clínica.

Gràcies també a l'Anna Gresely, que ja fa temps que va deixar l'*Apoteam*, però encara tenim feina en comú.

I també gràcies a persones que vau formar part del grup i que ara esteu immersos en altres projectes, com la Teresa (ευχαριστώ!), la Ifigènia i l'Anna Bellmunt.

I gràcies a la Núria, que tot i que hem coincidit poc temps, m'ha ajudat en intentar deixar enllestida la feina que tinc a mig fer.

Vull també recollir aquí a tota la gent de la segona planta del CEK, amb qui cada dia convivim i que fan el dia a dia més enriquidor, especialment la Marta Diví, que aconseguix que cada dia l'engranatge de la planta funcioni.

I és clar, tot això no tindria sentit sense els pacients, per qui i amb qui treballem per intentar fer la seva vida una mica més confortable.

No puc deixar-me d'agrair a la Marta-chuches la seva gran aportació en aquesta tesi! La seva administració de glucosa diària ha fet que mai no baixessin les forces per seguir corrent darrere els ratolins!

A part de la meva gran família del *lab*, em guardo aquest darrer paràgraf de la tesi per donar les gràcies ben fortes a la meva família, que segur que no han entès res del que diu aquí (Al, tu una mica potser sí...), però tot i així, es deuen sentir ben orgullosos. Gràcies pare i gràcies mare, i gràcies Sergi (com a castic de no poder venir a la tesi, te l'hauràs de llegir sencera i et faré un examen!). Gràcies a la meva família d'Olot: Carme, Josep, Marc, Yolanda i Pol (Pol, el proper en llegir una tesi seràs tu, vés assajant!). I Al, per tu sobren les paraules.

En definitiva, gràcies a tots els que heu estat al meu costat.



