

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Biomedicína

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



MUDr. Magdalena Klánová

Experimentální terapie B-nehodgkinských lymfomů

Experimental therapy of B-cell Non-Hodgkin's lymphomas

Disertační práce

Školitel: Doc. MUDr. Pavel Klener Ph.D.

Praha, 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 15.05.2017

Magdalena Klánová

Identifikační záznam:

KLÁNOVÁ, Magdalena. *Experimentální terapie B-nehodgkinských lymfomů* [Experimental therapy of B-cell Non-hodgkin's lymphomas]. Praha, 2017. Počet stran: 115; počet příloh: 0. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav patologické fyziologie. Vedoucí závěrečné práce/Školitel: doc. MUDr. Pavel Klener Ph.D.

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli doc. MUDr. Pavlu Klenerovi Ph.D. za jeho skvělé odborné vedení, neutuchající vědecké nadšení a velmi přátelský přístup.

Děkuji také Mgr. Tomášovi Zikmundovi za jeho pomoc a podporu v průběhu celého postgraduálního studia.

Dále bych chtěla poděkovat všem zaměstnancům Ústavu patologické fyziologie (vědeckým pracovníkům, učitelům) za motivující a především velmi přátelské pracovní prostředí.

Obsah

1	ABSTRAKT	6
2	ABSTRACT	8
3	SEZNAM ZKRATEK	10
4	LITERÁRNÍ ÚVOD	13
4.1	Vývoj B lymfocytů ve vztahu k lymfomagenezi	13
4.2	B-nehodgkinské lymfomy a jejich fyziologické protějšky	15
4.3	Onkogenní mechanismy uplatňující se v patogenezi B-nehodgkinských lymfomů	17
4.3.1	Programovaná buněčná smrt (apoptóza).....	17
4.3.2	Buněčný cyklus a inhibitory cyklin-dependentních kináz	25
4.3.3	Role vybraných signálních drah v patogenezi B-nehodgkinských lymfomů.....	28
4.4	Terapie B-nehodgkinských lymfomů	36
4.4.1	Terapie difúzního velkobuněčného B-lymfomu	37
4.4.2	Terapie lymfomu z plášťových buněk	37
4.4.3	Cytarabin v léčbě lymfomu z plášťových buněk	38
5	VÝCHODISKO PRO FORMULOVÁNÍ VÝZKUMNÝCH CÍLŮ A HYPOTÉZ	40
6	CÍLE	41
7	METODY	43
8	VÝSLEDKY	44
8.1	Publikace číslo 1	45
8.2	Publikace číslo 2	57
8.3	Publikace číslo 3	62
8.4	Publikace číslo 4	74
9	DISKUSE	88
9.1	Publikace číslo 1:	88
9.2	Publikace číslo 2:	90
9.3	Publikace číslo 3:	91
9.4	Publikace číslo 4:	94
10	ZÁVĚRY	97
11	LITERÁRNÍ ZDROJE	98

1 ABSTRAKT

Agresivní ne Hodgkinovy lymfomy vycházející z B-lymfocytů (B-NHL) představují heterogenní skupinu vzácných hematologických malignit vznikajících nádorovou transformací tzv. periferních lymfocytů v průběhu jejich diferenciaci v sekundárních lymfatických orgánech. Difúzní velkobuněčný B-lymfom (DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma) a lymfom z pláštěvých buněk (MCL, mantle cell lymphoma) jsou agresivní typy B-NHL. V jejich patogenezi se uplatňuje zejména narušení mechanismů programované buněčné smrti, buněčného cyklu či oprav poškozené DNA. Identifikovány byly také abnormálně aktivované signální dráhy, které vedou ke zvýšení proliferace nádorových buněk či inhibici apoptózy. Poznání těchto mechanismů umožňuje vyvíjet a experimentálně testovat nová protinádorová léčiva, která cíleně blokuji onkogenní kaskády rekurentně nalézané u jednotlivých typů B-NHL.

MCL je agresivní typ B-NHL s nepříznivou prognózou. *In vivo* modely lidského MCL pro experimentální terapii tohoto onemocnění však dosud chyběly. Zavedli a charakterizovali jsme několik modelů lidského MCL pomocí xenotransplantace primárních buněk a ustálených linií MCL do imunodeficitních myší. Prokázali jsme, že buňky přiložené a proliferující v myších tkáních jsou biologicky odlišné a mají komplexní změny genové exprese, fenotypu a senzitivity k cytotoxickým látkám ve srovnání s *in vitro* rostoucími MCL buněčnými liniemi (práce č.1). Tyto závěry mohou být významným přínosem pro preklinický výzkum.

Randomizovaná klinická studie Evropské skupiny pro MCL prokázala, že alternace režimu R-CHOP (rituximab, cyklofosfamid, doxorubicin, vinkristin, prednison) s režimem R-DHAP (rituximab, dexamethazon, cisplatina, HDAC) signifikantně zlepšuje celkové přežití pacientů s MCL ve srovnání s chemoterapií R-CHOP. Dosud však nebylo jasné, která komponenta režimu DHAP (cisplatina, cytarabin, či jejich kombinace) vede ke zlepšení přežívání pacientů s MCL. Nedávno publikované výsledky Nordické lymfomové skupiny ukázaly, že monoterapie HDAC (v kombinaci s rituximabem) není u mladších pacientů s agresivními formami MCL dostatečně efektivní (studie byla předčasně ukončena). S využitím námi odvozených myších modelů lidského MCL jsme experimentálně ukázali, že cisplatina v monoterapii či kombinace cisplatin s cytarabinem je účinnější ve srovnání s cytarabinem podávaným v monoterapii (práce č.2). Naše závěry tak potvrzují závěry klinické studie

Nordické lymfomové skupiny, a to že HDAC podávaný v monoterapii není dostatečně účinnou léčbou u agresivních forem MCL.

U části DLBCL nacházíme zvýšenou expresi antiapoptotického proteinu BCL2 (B-cell lymphoma 2), jež je asociována s nepříznivou prognózou. Expresní profil a prognostický význam dalších antiapoptotických proteinů rodiny BCL2 jako je MCL1 (myeloid-cell leukemia sequence 1) a BCL-XL (B-cell lymphoma-extra large) pro přežívání buněk DLBCL nebyl dosud systematicky zkoumán. Cílenou inhibicí jednotlivých antiapoptotických proteinů jsme zjistili, že DLBCL může být rozdělen na biologicky odlišné podskupiny podle závislosti na antiapoptotickém proteinu BCL2 a/nebo MCL1 (viz práce č.1). Role proteinu BCL-XL se zdá být minoritní. Podskupina BCL2 pozitivních DLBCL obsahuje jak BCL2-, tak MCL1-dependentní případy, které mohou být farmakologicky inhibovány pomocí cíleného nízkomolekulárního inhibitoru BCL2 proteinu s názvem venetoclax (ABT-199 / GDC0199), rostlinného alkaloidu homoharingtoninu (HHT, snižuje expresi MCL1), či jejich kombinace (s významným synergickým efektem), podskupina BCL2-negativních DLBCL se zdá být převážně závislá na proteinu MCL1. Tyto výsledky mohou mít přímý dopad na nové koncepty experimentální terapie DLBCL cílené na inhibici proteinů BCL2 a/nebo MCL1.

Vysokodávkovaný cytarabin (HDAC, high-dose cytarabine) se stal standardní součástí léčby mladších pacientů s MCL. Přesto pacienti prodělávají návrat (relaps) choroby i po léčbě založené na HDAC. Molekulární mechanismy rezistence na cytarabin nebyly u lymfomů (na rozdíl od akutních leukémií) systematicky zkoumány. Za účelem studia mechanismů rezistence na cytarabin jsme odvodili několik klonů ustálených MCL linií rezistentních na cytarabin (viz práce č.3). Zjistili jsme, že hlavním mechanismem získané rezistence k cytarabinu je snížení exprese deoxycytidinkinázy (DCK), enzymu, který je nezbytný pro fosforylaci, a tedy aktivaci nukleosidových analogů po jejich vstupu do buňky. Snížení exprese DCK vedle rezistence k cytarabinu způsobuje rezistenci k ostatním nukleosidovým analogům používaným v léčbě MCL (např. fludarabin, cladribin, gemcitabin), což jsme prokázali také *in vivo* na námi odvozených myších modelech lidského MCL. Výsledky naší práce naznačují, že pacienti, kteří progredují či relabují po režimu založeném na HDAC, by neměli být léčeni nukleosidovými analogy, konkrétně fludarabinem, gemcitabinem a kladribinem.

2 ABSTRACT

B-cell non-Hodgkin lymphomas (B-NHL) represent the most common mature lymphoproliferative diseases. B-NHL arise at different stages of B-cell development and represent their malignant counterpart. Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) and mantle cell lymphoma (MCL) are aggressive types of B-NHLs. Deregulation of cell cycle control, inhibition of apoptosis or abnormal DNA damage response play a key role in the pathogenesis of DLBCL and MCL. Aberrant activation of several signaling pathways that further promote survival, cell proliferation or affect the tumor microenvironment have been recently recognized. Increased understanding of the oncogenic mechanisms implicated in pathogenesis of B-NHL lead to development of novel agents that target the oncogenic drivers of distinct lymphoma subtypes.

MCL is an aggressive subtype of B-NHL associated with poor prognosis. *In vivo* models of human MCL for experimental therapy are however scarce. We established and characterized several mouse models of human MCL by xenotransplantation of either primary cells or established cell lines into immunodeficient mice (publication no 1). We demonstrated that engrafted MCL cells displayed complex changes of gene expression profile, phenotype and sensitivity to cytotoxic agents compared to the original *in vitro* growing control cell lines. These results can contribute to the preclinical research.

The randomized clinical trial of European MCL network demonstrated that the alternation of R-CHOP (rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone) with R-DHAP (rituximab, dexamethasone, cisplatin, HDAC) significantly improves the overall survival of MCL patients compared to R-CHOP alone. So far it has not been elucidated which component of the DHAP regimen (cisplatin, cytarabine, or the combination of both agents) is the key contributor of improved efficacy of the regimen. Recently published results of the Nordic Lymphoma Group MCL trial 5 showed, that single HDAC (in combination with rituximab) is insufficient for the treatment of younger patients with aggressive MCL and the study was prematurely terminated. Using our mouse models of human MCL we experimentally showed, that cisplatin, alone or with cytarabine, is significantly superior to single-agent cytarabine in eliminating lymphoma cells (publication no 2). Our data confirmed the results of the Nordic Lymphoma Group MCL trial 5 concluding that single-agent cytarabine is not appropriate treatment for biologically aggressive MCL.

BCL2 (B-cell lymphoma 2) gene is deregulated in subsets of DLBCL and overexpression of BCL2 protein is associated with adverse prognosis. The expression status as well as the role of other two key antiapoptotic BCL2 proteins such as MCL1 (myeloid-cell leukemia sequence 1) and BCL-XL (B-cell lymphoma-extra large) for the survival of DLBCL is less clear. By targeting of BCL2 proteins we demonstrated that DLBCL can be divided into biologically distinctive subgroups: BCL2 and/or MCL1 dependent, with minor role left for BCL-XL. BCL2-positive subgroup comprises both BCL2- and MCL1-dependent cells that might be pharmacologically targeted by specific BCL2 inhibitor, drug entitled venetoclax (ABT-199 / GDC0199), plant alkaloid homoharringtonin (HHT), or the combination of both agents (with a marked synergistic efficacy). BCL2-negative DLBCL subgroup appears to be predominantly MCL1-dependent (publication no 3). Our data might have direct implications for novel concepts of experimental therapy of DLBCL targeted at BCL2 and/or MCL1 using ABT-199 and HHT, single agent, or in combination

Implementation of high-dose cytarabine (HDAC) into induction therapy became standard-of-care for all newly diagnosed younger MCL patients. However, many patients relapse even after HDAC-based regimens. Molecular mechanisms responsible for cytarabine resistance in MCL (in contrast to acute leukemias) are unknown and optimal treatment strategy for relapsed/refractory MCL patients remains elusive. In order to study the mechanisms responsible for cytarabine resistance we derived several cytarabine-resistant clones from established MCL cell lines (see publication no 3). We demonstrated that acquired resistance of MCL cells to cytarabine is associated with marked downregulation of deoxycytidinkinase (DCK), an enzyme responsible for the first phosphorylation and thus activation of nucleoside analogs following their entry to the cell. The downregulation of DCK results not only in cytarabine resistance but leads to cross resistance to other nucleoside analogs used in the therapy of MCL (i.e. fludarabine, cladribine, gemcitabine). These results were confirmed in vivo using our established mouse models of human MCL (publication no 4). Our data suggest that nucleoside analogs (namely fludarabine, cladribine and gemcitabine) should not be used for the second-line therapy of MCL patients, who fail after cytarabine-based regimen.

3 SEZNAM ZKRATEK

ABC	aktivované B lymfocyty (activated B cells)
AID	aktivací indukovaná cytidin deamináza (activation-induced cytidine deaminase)
APAF-1	faktor aktivující kaspázy (apoptotic protease-activating factor 1)
Ara-CMP	cytarabinmonofosfát
Ara-CTP	cytarabintrifosfát
ASCT	autologní transplantace krvetvorných buněk (autologous stem cell transplant)
ATM	tumor-supresorový gen (ataxia teleangiectasia mutated)
ATP	adenosintrifosfát (adenosin triphosphate)
BAD	proapoptotický protein (BCL2 antagonist of cell death)
BAK	proapoptotický protein (BCL2 antagonist/killer)
BAX	proapoptotický protein (BCL2-associated X protein)
BCL-XL	antiapoptotický protein (B-cell lymphoma-extra large)
BCL2	antiapoptotický protein (B-cell lymphoma 2)
BCL6	transkripční faktor (B-cell lymphoma 6)
BCL10	proapoptotický protein (B-cell CLL/lymphoma 10)
BCR	receptor B lymfocytů (B cell receptor)
BH	konzervovaná oblast proteinů rodiny BCL2 (BCL2 homology domain)
BID	proapoptotický protein (BH3-interacting domain death agonist)
BIM	proapoptotický protein (BCL2 interacting mediator of cell death)
BLyS	cytokin aktivující B lymfocyty (B lymphocyte stimulator)
B-NHL	B nehodgkinské lymfomy
BTK	Brutonova tyrosin kináza
CARD11	enzym guanylát kináza (caspase recruitment domain-containing protein 11)
CBM	proteinový komplex obsahující proteiny CARD11-BCL10-MALT1
CCDN1	gen pro cyklin D1
CDK	cyklin-dependentní kináza
cFLIP	antiapoptotický protein (cellular FLICE (FADD-like IL-1 β -converting enzyme) -like inhibitory protein)

CKI	inhibitor cyklin dependentních kináz (cyclin-dependent kinase inhibitor)
CLL	chronická lymfocytární leukémie
CSR	izotypový přesmyk (class switch recombination)
DAG	diacylglycerol
dATP	deoxyadenosin trifosfát (deoxyadenosin triphosphate)
DCK	deoxycytidinkináza
DISC	proapoptoticky působící proteinový komplex (death inducing signaling complex)
DLBCL	difúzní velkobuněčný B-lymfom (diffuse large B-cell lymphoma)
EBV	Epstein-Barrové virus
ERK	serin/threoninová proteinová kináza (extracellular-signal-regulated kinase)
FLD	specifická oblast proteinu BCL2 (flexible loop domain)
GCB	B lymfocyty germinálních center (germinal centre B cells)
GSK3	serin/threoninová proteinová kináza (glycogen synthase kinase-3)
hENT	nukleosidový transportér (human equilibrative nucleoside transporter)
HHT	homoharintonin
HRK	proapoptotický protein (harakiri)
IAP	antiapoptotický protein (inhibitor of apoptosis protein)
IGH	těžký řetězec imunoglobulinu (immunoglobulin heavy chain)
IGL	lehký řetězec imunoglobulinu (immunoglobulin light chain)
IGHV	variabilní část těžkého řetězce imunoglobulinu (immunoglobulin heavy chain variable region)
IKK	kináza inhibitorů jaderných faktorů kappaB (inhibitor of kappaB kinase)
ITAM	cytoplazmatická část určitých membránových molekul (immunoreceptor tyrosine-based activation motif)
LD100	letální dávka vedoucí ke smrti 100% buněk
MALT1	cysteinová proteáza (mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1)
MAPK	mitogenem aktivovaná protein kináza (mitogen activated protein kinase)
MBR	hlavní oblast zlomu (major breakpoint region)

MCL	lymfom z plášťových buněk (mantle cell lymphoma)
MCL1	antiapoptotický protein (myeloid cell leukemia 1)
MDM2	enzym ubiquitin ligáza (mouse double minute 2 homolog)
MDM4	enzym ubiquitin ligáza (mouse double minute 4 homolog)
miR	mikroRNA
mTOR	proteinkináza (mammalian target of rapamycin)
MZL	lymfom z marginální zóny (marginal zone lymphoma)
NFAT	rodina transkripčních faktorů (nuclear factor of activated T cells)
NFκB	nukleární faktor kappa B
NSG	imunodeficitní myši, kmen NOD.Cg-Prkdc ^{scid} Il2rg ^{tm1Wjl} /SzJ
PIP ₂	fosfatidylinositol-4,5-bifosfát
PIP ₃	fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát
PI3K	fosfatidyl-inositol-3-kináza
PKCβ	proteinkináza Cβ
PLCγ2	fosfolipáza Cγ2
PMLBCL	primární mediastinální velkobuněčný B-lymfom (primary mediastinal large B-cell lymphoma)
PUMA	proapoptotický protein (p53 upregulated modulator of apoptosis)
RAG	gen účastnící se VDJ rekombinace (recombination activating gene)
R/R	relabující či terapeuticky refrakterní
SHM	somatická hypermutace
Smac/Diablo	proapoptotický protein (second mitochondrial-derived activator of caspases/direct inhibitor of apoptosis binding protein with low pI)
STAT3	transkripční faktor (signal transducer and activator of transcription 3)
TLR	toll-like receptor
TNF	proapoptotický faktor (tumor necrosis factor)
TORC1	proteinový komplex obsahující molekulu mTOR (TOR complex 1)
TORC2	proteinový komplex obsahující molekulu mTOR (TOR complex 2)
XIAP	antiapoptotický protein (X-linked inhibitor of apoptosis protein)
4E-BP1	inhibitor translace (4E-binding protein 1)

4 LITERÁRNÍ ÚVOD

4.1 Vývoj B lymfocytů ve vztahu k lymfomagenезi

B lymfocyty jsou buňky imunitního systému, které společně s T lymfocyty tvoří část specifické imunity lidského organismu. Pro tuto buněčnou populaci je charakteristický vícestupňový vývojový proces vyžadující řízené zásahy do genetické informace, ke kterým dochází při vyzrání B buněčného receptoru (BCR, B cell receptor). BCR je nezbytný pro vývoj i imunitní funkce B lymfocytů a je tvořen dvěma těžkými (IGH) a dvěma lehkými (IGL) řetězci, z nichž každý obsahuje variabilní a konstantní doménu. Zatímco konstantní část určuje izotyp antigenního receptoru (povrchového imunoglobulinu), variabilní oblast nese vysoce variabilní úseky, které jsou místem vazby antigenu. Těžký a lehký řetězec BCR je kódován odlišnými geny (lokus *IGH* pro těžký řetězec; *IGK* nebo *IGL* pro lehký řetězec). Specifickou vlastností B lymfocytů je, že geny pro oba řetězce BCR jsou cíleně modifikovány specializovaným enzymatickým aparátem, který odstraňuje a opětovně spojuje jednotlivé V (variable), D (diversity) a J (joining) části genu v případě těžkého řetězce nebo V a J části v případě řetězce lehkého a vytváří tak variabilní část BCR (Brack, Hírama et al. 1978). Proces V(D)J rekombinace zajišťuje dostatečný repertoár B buněčných receptorů pro reakci s antigenem a umožňuje tak účinně reagovat např. na přítomnost patogenu v organismu (LeBien and Tedder 2008). V(D)J rekombinace je iniciována působením komplexu enzymů zahrnujících proteiny RAG 1 (recombination activating gene) a RAG 2 a dochází při ní ke dvouvláknovým zlomům DNA a následné opravě DNA mechanismem nehomologního spojování konců DNA (Schatz, Oettinger et al. 1989; Fugmann, Lee et al. 2000). Právě tyto zásahy do DNA mohou predisponovat ke vzniku genetických změn souvisejících s maligní transformací vyvíjejícího se lymfocytu. Chybně probíhající VDJ rekombinace tak může být jednou z příčin vzniku lymfoproliferativních onemocnění (leukémií a lymfomů) (Nogai, Dorken et al. 2011).

Lymfoproliferativní onemocnění lze dělit z hlediska vývojového stadia lymfocytu, z něhož jsou odvozeny, na prekurzorové a periferní a dále podle typu lymfocytu na B- a T-lymfoproliferace. Periferní B lymfoproliferace se dále dělí na lymfom Hodgkinův a skupinu B nehodgkinských lymfomů (B-NHL), kam patří mimo jiné difúzní velkobuněčný B-lymfom (DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma) a lymfom z pláštěových buněk (MCL, mantle cell lymphoma) (Campo, Swerdlow et al. 2011). Bylo prokázáno, že chromozomální translokace t(14;18) u B-NHL vzniká

v důsledku abnormálně probíhající VDJ rekombinace (Jager, Bocskor et al. 2000). Působením komplexu obsahujícím rekombinázy RAG dochází ke zlomům v *IGH* lokusu (chromozom 14), který kóduje těžký řetězec BCR, a současně ke zlomům v definovaných oblastech genu *BCL2* (B-cell lymphoma 2) (chromozom 18), které mohou vést k reciproké chromozomální translokaci. Oblast zlomu genu *BCL2* (kóduje antiapoptotický protein BCL2, viz. dále) bývá nejčastěji lokalizována ve specifické oblasti dlouhé 150 párů nukleotidových bazí (MBR, major breakpoint region), která může být cílem štěpení rekombinázy RAG (Raghavan, Swanson et al. 2004). Bylo prokázáno, že zlom genu *BCL2* je nejčastěji lokalizován v dinukleotidových CpG sekvencích, pro něž je typická metylace cytosinu. Předpokládá se, že ke zlomu dochází v pozdní fázi VDJ rekombinace, kdy nezralé B lymfocyty začínají exprimovat enzym tzv. aktivací indukovanou cytidin deaminázu (AID, activation-induced cytidine deaminase). Methylovaný cytosin nacházející se v CpG sekvenci je nejprve tímto enzymem deaminován, čímž vzniká thymin a dochází tak k chybnému párování bazí (T:G). Oblast T:G nepárování je následně štěpena rekombinázy RAG a vzniká dvouvláknový zlom DNA (Tsai, Lu et al. 2008). Podobným mechanismem může vzniknout zlom ve specifické oblasti genu pro cyklin D1 (*CCND1*) na chromozomu 11 a zároveň v *IGH* lokusu na chromozomu 14. Výsledná chromozomální translokace t(11;14) je charakteristická pro MCL (Bosch, Jares et al. 1994).

Pouze ty B lymfocyty, které provedly V(D)J rekombinaci úspěšně tzn. je zachován čtecí rámec genů obou podjednotek receptoru a produkuje se funkční protein, mohou opustit kostní dřeň a následně dozrávat v sekundárních lymfoidních orgánech. Tyto tzv. naivní B lymfocyty migrují do sekundárních lymfoidních orgánů, kde se setkávají s antigenem, který je stimuluje k aktivitě a může docházet k dalšímu řízenému zásahu do genetické informace tzv. somatickým hypermutacím (SHM, somatic hypermutation) a izotypovému přesmyku (CSR, class switch recombination). Proces somatické hypermutace je zprostředkován enzymem AID a dochází při něm k mutacím (bodové mutace, delece, inserce) v genech kódujících variabilní část lehkého a těžkého řetězce BCR (Muramatsu, Kinoshita et al. 2000). SHM zajišťuje produkci protilátek s vysokou afinitou vůči imunizujícímu antigenu (Goossens, Klein et al. 1998). Bylo prokázáno, že u DLBCL (na rozdíl od fyziologických B lymfocytů germinálního centra) je cílem aberantní somatické hypermutace řada genů, zahrnujících také některé protoonkogeny. Tímto mechanismem bývá u DLBCL mutován např. protoonkogen *BCL6* (B-cell lymphoma 6) (Pasqualucci, Migliozza et al. 1998). SHM indukovaná

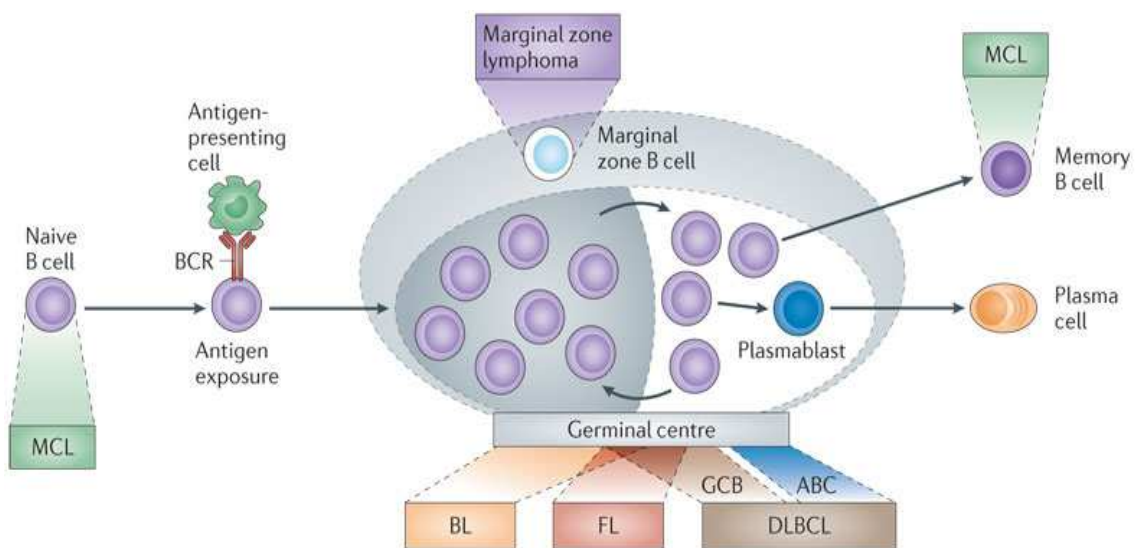
mutace genu *BCL6* (kóduje transkripční faktor BCL6) postihuje jeho regulační sekvenci a znemožňuje inhibici jeho exprese (Pasqualucci, Migliazza et al. 2003). U významné části DLBCL byly dále detekovány mutace genů *PIMI*, *MYC*, *RhoH/TTF* a *PAX5*, jako důsledek aberantní SHM (Pasqualucci, Neumeister et al. 2001). Izotypový přesmyk je také zajišťován enzymem AID a dochází při něm k přestavbě genových segmentů pro konstantní části těžkého řetězce imunoglobulinu (variabilní doména je zachována). Izotypový přesmyk umožňuje náhradu původní konstantní části imunoglobulinu (IgM, IgD) za jiný izotyp (IgA, IgE, IgD) a tím získat imunoglobulinu další vlastnosti např. v případě izotypu IgA schopnost přecházet na slizniční povrchy. Bylo prokázáno, že abnormálně probíhající izotypový přesmyk může způsobovat u DLBCL chromozomální translokace zahrnující geny *BCL6*, *MYC* a *SPIB* (Lenz, Nagel et al. 2007).

4.2 B-nehodgkinské lymfomy a jejich fyziologické protějšky

B-NHL mohou vzniknout na jakémkoliv stupni vývoje B lymfocytu (Nogai, Dorken et al. 2011) (**Obrázek 1**). Bylo zjištěno, že MCL vzniká ze dvou odlišných vývojových stadií B lymfocytů. Asi v jedné až dvou třetinách případů MCL (dle různých studií) nacházíme geny kódující variabilní část těžkého řetězce imunoglobulinu (*IGHV*) v zárodečné, nemutované konfiguraci (shodné s naivním B lymfocytem), což naznačuje vznik tohoto onemocnění z populace naivních pregerminálních B lymfocytů. U zbylých případů je fyziologickým protějškem buněk MCL B lymfocyt, který se již setkal s antigenem a prodělal SHM. V tomto případě je přítomna mutovaná sekvence *IGHV* lokusu (Kienle, Krober et al. 2003; Hadzidimitriou, Agathangelidis et al. 2011). Práce publikované v poslední době se zabývají otázkou účasti antigenů při vzniku MCL. Analýzou 807 vzorků získaných od pacientů s nově diagnostikovaným MCL bylo zjištěno, že téměř v polovině případů je přítomen relativně omezený repertoár *IGHV* genů (*IGHV3-21*, *IGHV4-34*, *IGHV1-8* a *IGHV3-23*), které kódují variabilní část těžkého řetězce imunoglobulinu. Popsané geny se navíc nachází v určitých stereotypních konfiguracích s dalšími kódujícími oblastmi genu *IGH* (*IGHD* a *IGHJ*), které jsou odlišné od ostatních lymfoproliferací (např. chronické lymfatické leukémie (CLL) a lymfomu z marginální zóny (MZL)). Určité konfigurace *IGHV-IGHD-IGHJ* oblastí využívající při VDJ rekombinaci konkrétní *IGHV* geny (*IGHV3-21*, *IGHV4-34*, *IGHV3-23*) jsou z nejasných důvodů s vyšší pravděpodobností cílem SHM. Přítomnost omezeného repertoáru imunoglobulinových genů a cílené SHM u MCL naznačuje

selekcí výhodu určitých klonů B lymfocytů a potenciální vliv antigenů při vzniku MCL (Hadzidimitriou, Agathangelidis et al. 2011).

Bylo prokázáno, že také DLBCL vzniká z různých vývojových stádií B lymfocytů. Studium profilů genové exprese prokázalo, že DLBCL lze dělit na molekulární podtypy. Geny zvýšeně exprimované jednotlivými molekulárními podtypy DLBCL korespondují s expresním profilem těch vývojových stádií B lymfocytů, na jejichž úrovni došlo k maligní transformaci (Alizadeh, Eisen et al. 2000). Rozlišujeme tak DLBCL analogický buňkám zárodečných center (GCB, germinal centre B cell-like) nebo postgerminálním aktivovaným B buňkám (ABC, activated B cell-like) (Alizadeh, Eisen et al. 2000). Bylo prokázáno, že v patogenezi jednotlivých molekulárních podtypů DLBCL se uplatňují odlišné onkogenní mechanismy (viz. dále) (Lenz, Wright et al. 2008). Určením podtypu DLBCL lze predikovat prognózu pacientů, která je při léčbě standardní kombinovanou imunochemoterapií R-CHOP (rituximab, cyklofosfamid, doxorubicin, vinkristin, prednison) významně lepší pro GCB podtyp DLBCL ve srovnání s ABC DLBCL (Rosenwald, Wright et al. 2002; Scott, Wright et al. 2014).



Nature Reviews | Cancer

Obrázek 1: Vývojová stadia B lymfocytů a jednotlivé typy lymfomů, které z nich vznikají. Lymfom z plášťových buněk (MCL, mantle cell lymphoma), Burkittův lymfom (BL), Folikulární lymfom (FL), Difúzní velkobuněčný B-lymfom (DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma), DLBCL analogický buňkám zárodečných center (GCB, germinal centre B cell-like), DLBCL analogický postgerminálním aktivovaným B buňkám (ABC, activated B cell-like), povrchový receptor B lymfocytů (BCR, B-cell receptor). Převzato z publikace: (Scott and Gascoyne 2014).

4.3 Onkogenní mechanismy uplatňující se v patogenezi B-nehodgkinských lymfomů

Při vývoji B lymfocytů dochází opakovaně k zásahům do genetické informace již zmíněnými mechanismy V(D)J rekombinace, izotopového přesmyku a somatické hypermutace. Abnormální průběh těchto dějů může vést ke vzniku chromozomálních translokací či mutací protoonkogenů, které mohou predisponovat ke vzniku lymfoproliferativních onemocnění. Vznik nádorového onemocnění je však vícestupňový proces a pro maligní transformaci vyvíjejícího se lymfocytu je většinou nutná akumulace vyššího počtu onkogenních genetických změn. Např. důsledkem abnormálně probíhající VDJ rekombinace může ve stadiu pre-B lymfocytu dojít ke vzniku chromozomální translokace t(11;14), která je charakteristická pro MCL (Bosch, Jares et al. 1994). Předpokládá se, že tato chromozomální translokace, vedoucí ke zvýšené expresi cyklinu D1, je iniciálním onkogenním mechanismem, ale sama o sobě není postačující pro vznik MCL, což bylo prokázáno na myších modelech s transgenní expresí cyklinu D1 (Bodrug, Warner et al. 1994; Lovec, Grzeschiczek et al. 1994). Při vzniku lymfomů dochází k akumulaci velkého počtu sekundárních genetických změn, které narušují mechanismy programované buněčné smrti (apoptózy), regulace buněčného cyklu a oprav DNA (Morin, Mendez-Lago et al. 2011; Pasqualucci, Trifonov et al. 2011; Lohr, Stojanov et al. 2012; Bea, Valdes-Mas et al. 2013; Zhang, Jima et al. 2014). Identifikovány byly také aberantně aktivované signální dráhy např. dráha B buněčného receptoru, PI3 kinázy (fosfatidyl-inositol-3-kináza)/Akt/mTOR (mammalian target of rapamycin), a dráha jaderných faktorů κ B (NF κ B, nuclear factor κ B). Nadměrná aktivace těchto signálních kaskád může vést k inhibici apoptózy, zvýšení proliferace nádorových buněk, či ovlivnění interakcí lymfomových buněk s nádorovým mikroprostředím (Vivanco and Sawyers 2002; Jost and Ruland 2007; Young and Staudt 2013). Jmenované onkogenní mechanismy budou popsány v následujícím literárním přehledu zejména se zaměřením na molekuly, které jsou cílem experimentální terapie nebo současného klinického testování.

4.3.1 Programovaná buněčná smrt (apoptóza)

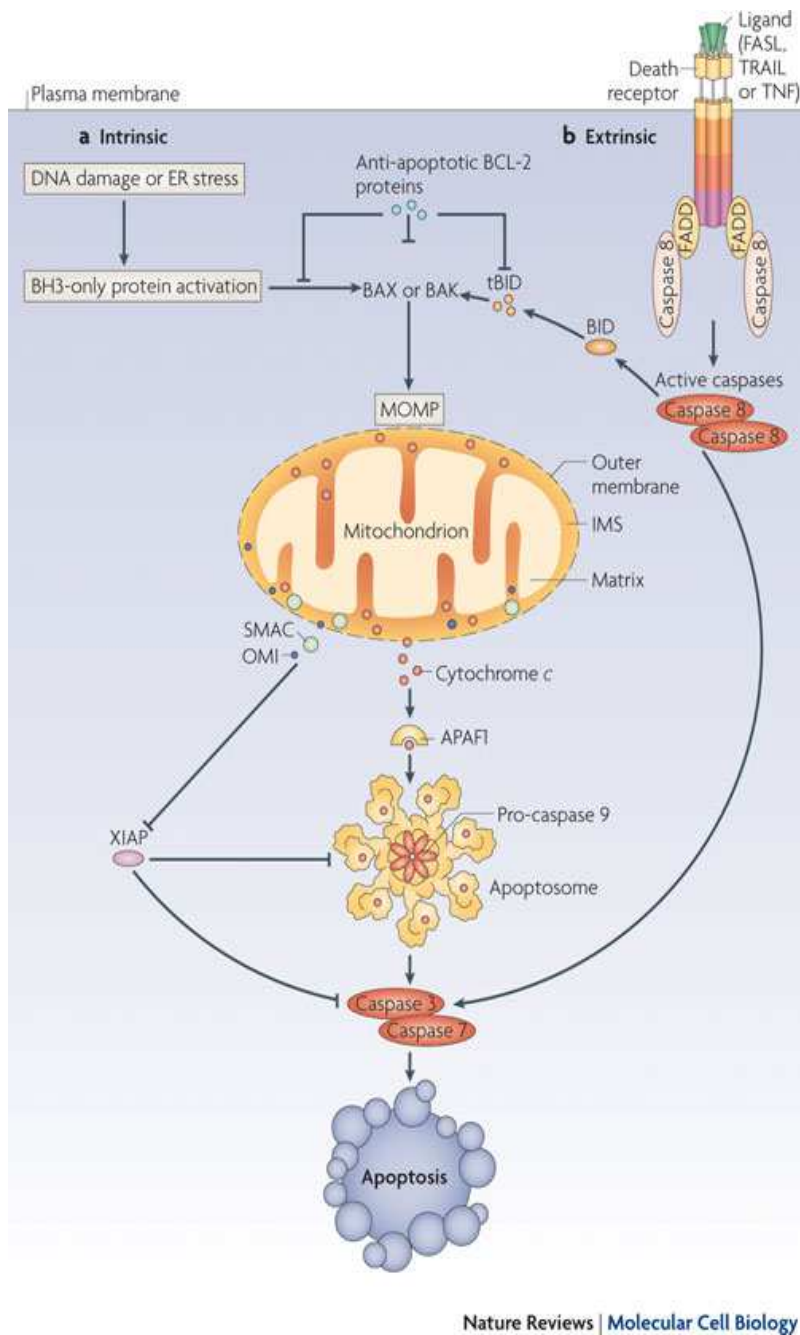
Apoptóza představuje přirozenou ochranu organismu proti vzniku nádorového onemocnění, protože tímto mechanismem mohou být odstraňovány pro organismus potenciálně nebezpečné buňky. Apoptóza je na rozdíl od nekrózy kontrolovaným

procesem a může být v buňkách spouštěna dvěma alternativními drahami: buď extracelulárním spouštěčem (vnější dráha apoptózy) nebo intracelulárně v důsledku aktivace apoptotických regulačních proteinů (vnitřní dráha apoptózy). Vnější dráha aktivace apoptózy je iniciována např. ztrátou buněčného kontaktu s extracelulární matrix (tzv. anoikis), deplecí ligandu nutného k přežití buňky (signalizování prostřednictvím tzv. „dependence“ receptorů), uvolněním perforinů a granzymů na cílovou buňku cytotoxickými T lymfocyty a NK buňkami a dále velice důležitou vazbou tzv. „smrtících“ ligandů z proteinové rodiny TNF (tumor necrosis factor), jako je např. ligand TNF α nebo FAS, na jejich specifické receptory (Elmore 2007; Brenner, Blaser et al. 2015). Specifickou vazbou ligandu na TNF receptor dochází k formování multiproteinového komplexu DISC (death inducing signaling complex) na cytosolické straně buněčné membrány a aktivaci pro apoptózu specifických endoproteáz, tzv. kaspáz (caspase, cysteine-dependent aspartate-directed proteases). V komplexu DISC je nejprve aktivována iniciační kaspáza (kaspáza 8), která následně proteolyticky štěpí a tím aktivuje kaspázy efektorové (kaspázu 3, 6 a 7). Aktivované efektorové kaspázy pak štěpí regulační a strukturální proteiny uvnitř buňky a vedou k její řízené smrti (Ashkenazi 2002; Aggarwal 2003), **Obrázek 2**.

Vnitřní neboli mitochondriální dráha aktivace apoptózy může být aktivována např. oxidativním stresem, hypoxií, aktivací onkogenů nebo nevratným poškozením DNA. Významnou roli pro spuštění mitochondriální apoptózy má nádorový supresor a transkripční faktor p53. Pokud je buňka vystavena výše jmenovaným stresorům, dochází k uvolnění proteinu p53 z vazby s regulačními proteiny MDM2/MDM4 (mouse double minute 2/4 homolog) a jeho stabilizaci a aktivaci (Oliner, Pietenpol et al. 1993; Danovi, Meulmeester et al. 2004). Protein p53 pak aktivuje transkripci cílových genů, které jsou nezbytné pro spuštění apoptózy (např. geny pro proapoptotické proteiny BAX (BCL2-associated X protein), NOXA a PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis)) (Oda, Ohki et al. 2000; Nakano and Vousden 2001), ale také pro zástavu buněčného cyklu, senescenci či opravy poškozené DNA (Biegging, Mello et al. 2014). Vedle ovlivnění transkripce cílových tzv. proapoptotických genů může protein p53 aktivovat mitochondriální apoptózu přímo a to interakcí s proteiny rodiny BCL2 (viz dále) (Talos, Petrenko et al. 2005).

Aktivace mitochondriální apoptózy směřuje především ke zvýšení propustnosti vnější mitochondriální membrány pro proapoptoticky působící molekuly jako je např. Smac/Diablo (second mitochondrial-derived activator of caspases/direct inhibitor of

apoptosis binding protein with low pI) a cytochrom c, které se v cytoplasmě za normálních okolností nevyskytují. Protein Smac/diablo působí proapoptoticky tím, že po uvolnění z mitochondrií vyvazuje inhibitory apoptotických proteinů (IAP, inhibitor of apoptosis protein), které jsou např. schopny interagovat s kaspázami a inhibovat jejich funkci (Liu, Sun et al. 2000). Nejlépe prostudovaným z proteinů IAP je protein XIAP (X-linked IAP), který má vedle schopnosti inhibovat aktivaci kaspáz (např. kaspázy 9) či blokovat již aktivované kaspázy (např. kaspázu 3 a 7) ještě ubiquitin-ligázovou aktivitu. Protein XIAP je schopen ubiquitinem označit některé významné proapoptotické proteiny, které jsou následně likvidovány proteasomem (Scott, Denault et al. 2005; Schile, Garcia-Fernandez et al. 2008). Cytochrom c se za normálních okolností nachází v mezimembránovém mitochondriálním prostoru a účastní se procesu přenosu elektronů v elektron-transportním řetězci. Pokud je však cytochrom c uvolněn do cytoplasmy, může asociovat s dalšími molekulami jako např. Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor 1), dATP (deoxyadenosin trifosfát) a neaktivní prokaspázou 9 a společně vytvářet multiproteinový komplex tzv. apoptosom (Acehan, Jiang et al. 2002). V apoptosomu dochází podobně jako v komplexu DISC k aktivaci iniciační kaspázy (kaspázy 9) a následně aktivaci efektorové kaspázy (kaspázy 3), která štěpí buněčné substráty nutné pro dokončení celého procesu apoptózy (Saleh, Srinivasula et al. 1999) (**Obrázek 2**). Významnou roli v regulaci propustnosti zevní mitochondriální membrány a tím i v aktivaci vnitřní dráhy apoptózy hrají proteiny z rodiny BCL2.



Obrázek 2: A Aktivace vnitřní (mitochondriální) dráhy apoptózy vede za účasti proteinů rodiny BCL2 ke zvýšení propustnosti vnější mitochondriální membrány a uvolnění proapoptoticky působících molekul (cytochrom C, SMAC), které spolu s dalšími proteiny (APAF1) vytváří multiproteinový komplex, apoptosom. V apoptosomu dochází k aktivaci iniciační kaspázy (kaspáza 9) a následné aktivaci efektorových kaspáz (kaspáza 3 a 7), které štěpí významné buněčné proteiny, což vede k dokončení procesu apoptózy. **B** Aktivace vnější dráhy apoptózy je spouštěna např. navázáním tzv. smrtících ligandů (FASL, TRAIL, TNF α) na jejich specifické

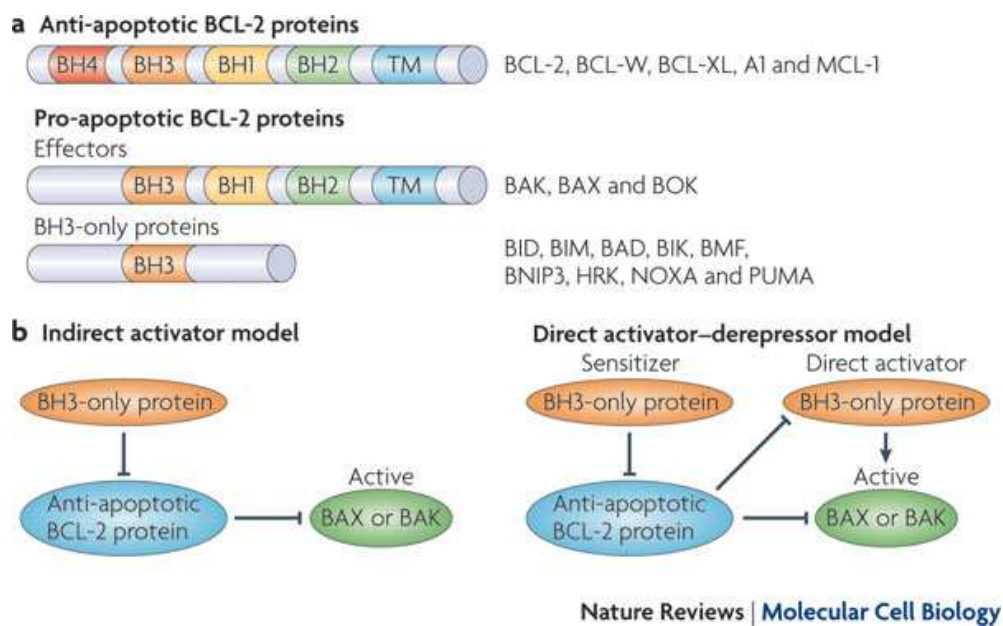
receptory a vzniku multiproteinového komplexu, v němž dochází k aktivaci iniciační kaspázy (kaspáza 8) a následné aktivaci efektorových kaspáz (kaspáza 3, 7) a dokončení apoptózy. Převzato z publikace: (Tait and Green 2010).

4.3.1.1 Význam BCL2 proteinů v apoptóze

BCL2 proteiny mohou být podle funkce a struktury (přítomnost BCL2 homologních (BH) domén) proteinu rozděleny do tří skupin (**Obrázek 3**). První skupinu tvoří multidoménné proapoptotické proteiny např. BAX a BAK (BCL2 antagonist/killer), které obsahují ve své struktuře tři BCL2 homologní domény (BH1, BH2 a BH3). Po aktivaci jsou tyto proteiny schopny přímo vytvářet póry v zevní mitochondriální membráně, tím zvyšovat její propustnost pro molekuly mezimembránového prostoru a iniciovat apoptózu (Korsmeyer, Wei et al. 2000). Druhou skupinu představují proapoptotické proteiny, tzv. BH3 proteiny obsahující pouze jednu BCL2 homologní doménu (BH3), která je nezbytná pro interakci s ostatními BCL2 proteiny. BH3 proteiny lze rozdělit na tzv. přímé aktivátory apoptózy, proteiny BIM (BCL2-interacting mediator of cell death) a BID (BH3-interacting domain death agonist), které jsou schopny vázat a přímo aktivovat proapoptotické proteiny BAX a BAK. Aktivované proteiny BAX a BAK podléhají konformační změně, oligomerizují a jak bylo popsáno, vytváří póry v zevní mitochondriální membráně (Wei, Lindsten et al. 2000; Kuwana, Bouchier-Hayes et al. 2005). Tzv. senzitizerů, proteiny NOXA, BAD (BCL2 antagonist of cell death), PUMA a HRK (harakiri) nemohou přímo aktivovat proteiny BAX a BAK, ale působí proapoptoticky tím, že se vážou na antiapoptotické proteiny a tím vytěsňují z vazby aktivátory nebo monomery aktivních proteinů BAX a BAK (Letai, Bassik et al. 2002). Do třetí skupiny BCL2 proteinů spadají antiapoptotické BCL2 proteiny: BCL2, MCL1 (myeloid-cell leukemia sequence 1), BCL-XL (B-cell lymphoma-extra large), BCL-W a A1, které obsahují čtyři BCL2 homologní domény (BH1, BH2, BH3, BH4). Mechanismem jejich antiapoptotického působení je vyvazování aktivátorů (BIM a BID) nebo aktivovaných efektorových proteinů BAX a BAK (Lindsten, Ross et al. 2000). Vazba mezi antiapoptotickými BCL2 proteiny a BH3 proteiny je selektivní a probíhá s různou afinitou. Např. pouze antiapoptotický protein MCL1 váže protein NOXA. Naopak všechny antiapoptotické BCL2 proteiny mohou vázat protein BIM, přičemž nejvyšší afinitu k proteinu BIM mají proteiny BCL2, BCL-XL a MCL1 (Certo, Del Gaizo Moore et al. 2006). Vzájemné interakce mezi BCL2 proteiny regulují zvýšení propustnosti zevní mitochondriální membrány a tím zprostředkovaně rozhodují, zdali buňka podlehne apoptóze. Pokud je buňka vystavena stresorům dochází k aktivaci těchto proteinů transkripcí či posttranslačními modifikacemi. Jak již bylo zmíněno výše, protein p53 může indukovat

transkripci proapoptických proteinů PUMA a NOXA (Nakano and Vousden 2001). Vlivem proapoptických stimulů může být např. protein BIM uvolňován z dyneinového motorového komplexu asociovaného s mikrotubuly (Puthalakath, Huang et al. 1999) a protein BAD defosforylován, což umožňuje jeho interakci s antiapoptickým proteinem BCL-XL (Zha, Harada et al. 1996).

Inhibice apoptózy je jedním ze znaků nádorových buněk a řada typů nádorů zvýšeně exprimuje antiapoptické BCL2 proteiny. Bylo však prokázáno, že pouze ty antiapoptické BCL2 proteiny, které vážou BH3 aktivátory, zajišťují signály nezbytné pro přežívání nádorových buněk (Ryan, Brunelle et al. 2010). Studium interakcí jednotlivých BCL2 proteinů je důležité z hlediska predikce senzitivity nádorových buněk vůči inhibitorům antiapoptických proteinů rodiny BCL2 (Certo, Del Gaizo Moore et al. 2006).



Obrázek 3: A Proteiny rodiny BCL2. Antiapoptické BCL2 proteiny (BCL2, MCL1, BCL-XL, BCL-W a A1) se čtyřmi BCL2 homologními (BH) doménami; Proapoptické BCL2 proteiny se dělí na multidoménové efektorové proteiny (BAX a BAK) se třemi BH doménami a tzv. BH3-only proteiny (např. BID, BIM, BAD, NOXA, PUMA, HRK), které mají ve své struktuře pouze jednu BH doménu (BH3). **B Nepřímý a přímý model aktivace mitochondriální apoptózy.** Nepřímý model předpokládá, že konstitutivně aktivované proteiny BAX a BAK jsou vázány antiapoptickými BCL2 proteiny. Apoptóza je spouštěna navázáním BH3 proteinů na antiapoptické BCL2 proteiny, což vede k uvolnění aktivovaných proteinů BAX a BAK. Přímý model předpokládá, že efektorové proapoptické proteiny BAX a BAK jsou aktivovány interakcí s BH3 proteiny, tzv. přímými aktivátory. Spuštění apoptózy je inhibováno antiapoptickými BCL2 proteiny, které vyvazují buď BH3 proteiny – přímé aktivátory anebo aktivované proteiny

BAX a BAK. BH3 proteiny - tzv. senzitivizéry nemohou přímo aktivovat proteiny BAX a BAK, ale působí proapoptoticky tím, že neutralizují antiapoptotické BCL2 proteiny. Převzato z publikace: (Tait and Green 2010).

4.3.1.2 Význam BCL2 proteinů v patogenezi difúzního velkobuněčného B-lymfomu a lymfomu z pláštových buněk

Gen *BCL2* kóduje stejnojmenný antiapoptotický protein, který hraje centrální roli v regulaci mitochondriální apoptózy (Hockenbery, Nunez et al. 1990). Práce využívající myší model transgenní exprese BCL2 v B lymfocytech dokazují, že jeho zvýšená intracelulární hladina může inhibovat apoptózu této buněčné populace a přispívat tak k lymfomagenezi (McDonnell, Deane et al. 1989). Deregulace genu *BCL2* vedoucí ke zvýšené expresi proteinu BCL2 je častým onkogenním mechanismem u řady lymfoproliferativních onemocnění včetně DLBCL a MCL. U jednotlivých molekulárních podtypů DLBCL se přitom uplatňují různé mechanismy deregulace genu *BCL2* (Gascoyne, Adomat et al. 1997). Pro GCB DLBCL jsou typické chromozomální translokace t(14;18), při nichž dochází k fúzi genu *BCL2* s regulační sekvencí genu pro těžký imunoglobulinový řetězec a následné zvýšené expresi proteinu BCL2 (Willis and Dyer 2000; Iqbal, Sanger et al. 2004). Bylo prokázáno, že u GCB DLBCL je *BCL2* nejčastěji mutovaným genem (Morin, Mendez-Lago et al. 2011) a tyto mutace jsou asociovány s přítomností translokace t(14;18). Významně vyšší výskyt určitých typů bodových mutací u GCB DLBCL naznačuje, že mutace *BCL2* genu vznikají při aberantní SHM (Peled, Kuang et al. 2008). Předpokládá se, že gen *BCL2* může být cílem SHM právě v důsledku jeho translokace na chromozom 14, kde se nachází *IGH* geny, které jsou fyziologicky cílem SHM (Saito, Novak et al. 2009; Schuetz, Johnson et al. 2012). Vzácně jsou pozorovány mutace v těch oblastech genu *BCL2*, které kódujících BH domény. Jak bylo popsáno výše, BH domény jsou místem interakce s proapoptotickými BCL2 proteiny a jsou také místem vazby syntetických inhibitorů proteinu BCL2 (Fresquet, Rieger et al. 2014). Nejvíce mutací je detekováno v oblasti genu, která kóduje tzv. FLD doménu (flexible loop domain), která je místem vazby proteinu p53. Mutace v doméně FLD mohou ovlivňovat interakce s proteinem p53 a následné uvolnění proapoptotických proteinů, ke kterému dochází vlivem konformační změny proteinu BCL2 po navázání p53 (Schuetz, Johnson et al. 2012). Mutace v oblasti kódující FLD doménu tak mohou ovlivňovat antiapoptotické vlastnosti proteinu BCL2. U ABC DLBCL se uplatňují zcela odlišné mechanismy nefyziologické exprese proteinu

BCL2, jako jsou amplifikace genu *BCL2* nebo zvýšení jeho transkripce v důsledku aktivace signální dráhy NF- κ B (Iqbal, Neppalli et al. 2006). Bez ohledu na podtyp DLBCL a molekulární mechanismy deregulující gen *BCL2*, je zvýšení exprese proteinu *BCL2* asociováno s nepříznivou prognózou (Hermine, Haioun et al. 1996).

Deregulace apoptózy se uplatňuje také v patogenezi MCL. Lokus 18q21.33 kódující gen *BCL2*, patří mezi tři nejčastěji amplifikované oblasti u pacientů s MCL (Bea, Salaverria et al. 2009). Zvýšená exprese proteinu *BCL2* v důsledku amplifikace genu *BCL2* však u MCL (na rozdíl od DLBCL) není asociována s horší prognózou onemocnění (Yi, Zou et al. 2015).

Mezi další významné antiapoptotické proteiny rodiny *BCL2* patří *MCL1* a *BCL-XL*. Význam těchto proteinů v patogenezi DLBCL nebyl doposud objasněn. V současnosti publikovaná data ukazují, že mRNA i proteinová exprese *MCL1* je významně vyšší u ABC DLBCL ve srovnání s GCB DLBCL, pravděpodobně v důsledku amplifikace genu *MCL1* nebo konstitutivní aktivace transkripčního faktoru STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) (Wenzel, Grau et al. 2013). Některé práce naznačují, že zvýšená exprese antiapoptotického proteinu *MCL1* může být jednou z příčin rezistence DLBCL na cytostatika běžně používaná v léčbě pacientů s tímto onemocněním (např. doxorubicin, etoposid, vinkristin) (Wenzel, Grau et al. 2013). Exprese proteinu *MCL1* u pacientů s MCL je heterogenní a některé práce naznačují pozitivní korelaci zvýšené exprese *MCL1* s vybranými negativními prognostickými ukazateli (blastoidní varianta MCL, zvýšená proliferativní aktivita dle Ki67) (Khoury, Medeiros et al. 2003). V patogenezi MCL může hrát významnou roli další protein z rodiny *BCL2* – proapoptotický protein *BIM*. Bylo zjištěno, že výlučně u MCL je ztráta tohoto proteinu způsobena homozygotní delecí kódujícího genu (Mestre-Escorihuela, Rubio-Moscardo et al. 2007). Na transgenním myším modelu bylo prokázáno, že delece genu *BIM* při současné zvýšené expresi cyklinu D1 vede ke vzniku onemocnění připomínající MCL u člověka (Katz, Labelle et al. 2014).

Z popsaného vyplývá, že narušení mechanismů apoptózy je častým onkogenním mechanismem u DLBCL a MCL. Vzhledem k tomu, že protinádorový efekt většiny cytostatik je zprostředkován spuštěním vnitřní apoptotické dráhy, může deregulace proteinů rodiny *BCL2* přispívat k rezistenci nádorových buněk vůči cytotoxickým látkám. Poznání těchto mechanismů vedlo k vývoji nových léčebných strategií cílených na inhibici antiapoptotických proteinů.

4.3.1.3 Inhibice antiapoptotických BCL2 proteinů

Inhibice antiapoptotických proteinů rodiny BCL2 je jednou z možností léčby B-NHL. Snahy o vývoj inhibitorů BCL2 proteinů (např. AT-101, ABT-737, ABT-263) nebo inhibitorů exprese jejich mRNA (např. oblimersen sodný) probíhají řadu let (Davids and Letai 2012). Protinádorový účinek syntetických inhibitorů antiapoptotických BCL2 proteinů je založen především na vysoké afinitě těchto inhibitorů ke specifickým vazebným oblastem antiapoptotických proteinů a schopnosti vytěsnit proapoptoticky působící molekuly (BH3 proteiny, multidoménové proteiny BAX a BAK) (Souers, Levenson et al. 2013). Apoptóza tak není indukována přímo, ale především se zvyšuje efekt proapoptotických signálů uvnitř buněk. V současnosti se u pacientů s lymfoproliferativními onemocněními testuje specifický inhibitor proteinu BCL2, látka s názvem venetoclax (ABT-199 / GDC0199) (Davids, Roberts et al. 2012; Souers, Levenson et al. 2013). Časně klinické studie naznačují jeho efektivitu u pacientů s některými podtypy B-NHL (Davids MS 2013; Seymour, Gerecitano et al. 2013). Dalším perspektivním inhibitorem BCL2 proteinů je látka s názvem obatoclax. Protinádorový účinek této látky je dán jeho vazbou na antiapoptotické proteiny BCL2, MCL1, BCL-XL a BCL-W (Nguyen, Marcellus et al. 2007). Tato látka již byla testována v klinických studiích zejména u pacientů s CLL a MCL (Goy, Hernandez-Ilzaliturri et al. 2014; Brown, Tesar et al. 2015).

4.3.2 Buněčný cyklus a inhibitory cyklin-dependentních kináz

Pro lymfoproliferativní onemocnění je mimo narušené schopnosti buněk vstupovat do apoptózy také charakteristická deregulace buněčného cyklu (Sanchez-Beato, Sanchez-Aguilera et al. 2003). Buněčný cyklus je tvořen čtyřmi základními fázemi (G1, S, G2, M), kterými musí prolifерující buňka projít, než dojde k jejímu rozdělení. První fáze buněčného cyklu tzv. fáze G1 je interval, v němž buňka obvykle roste a syntetizuje svůj biologický materiál. Posléze, stimulována extracelulárními mitogeny nebo antiproliferativními cytokiny, může vstupovat do další fáze buněčného cyklu tzv. fáze S a začít syntetizovat svou genomickou DNA, respektive může vstoupit do klidové fáze G0. Jakmile buňka vstoupí do S fáze buněčného cyklu je předurčena dokončit buněčný cyklus (Sherr 2000). Progrese z G1 do S fáze buněčného cyklu je přísně kontrolována 3 hlavními drahami: 1) p16INK4a-cyklin D-CDK4-Rb, 2) p14ARF-MDM2-p53-p21^{CIP1} a 3) p27^{KIP1}-cyklin E-CDK2, z nichž zejména první dvě

bývají s různou frekvencí narušeny u agresivních lymfoproliferativních onemocnění (Sherr 2000). Při mitogenní stimulaci (v G1 fázi) dochází k expresi a akumulaci cyklinů typu D v buňce a následně k jejich navázání na cyklin-dependentní kinázy (CDK) 4/6. Tyto kinázy pak v komplexu s cykliny D fosforylují a tím inaktivují protein pRb, který není již dále schopný vázat transkripční faktory E2F. Dochází tak k indukci transkripce genů regulovaných faktory E2F (geny nutné pro syntézu DNA, dále např. geny pro cyklin E a A) a progresi buněčného cyklu do S fáze (Sherr 2000). Cyklin E vytváří komplex s CDK2, který se podílí (vedle komplexu cyklin D/CDK4/6) na fosforylaci pRb a tím umožňuje průchod z G1 do S fáze buněčného cyklu. Dalším způsobem regulace kontrolního bodu G1 fáze (vedle funkčního proteinu pRb) je přítomnost intaktních inhibitorů CDK, které mohou být exprimovány např. v důsledku stresové odpovědi nebo prostřednictvím cytokinů inhibujících buněčnou proliferaci. Např. inhibitory rodiny INK4 (p16INK4a, p15INK4b, p18INK4c a p19INK4d) sekvestrují a tím inhibují aktivitu CDK 4/6 (Roussel 1999). Schopnost proteinů INK4 zastavit buněčný cyklus v G1 fázi je však závislá na funkčním proteinu pRb, který zůstává v důsledku inhibice CDK 4/6 v hypofosforylovaném stavu a nedochází tak k transkripci genů nutných pro průběh S fáze buněčného cyklu. Zároveň vytvořením komplexu proteinů INK4 s CDK 4/6 dochází k uvolnění dalších inhibitorů CDK: p21^{CIP1} a p27^{KIP1} z vazby na cyklin D-dependentní kinázy, následné inhibici komplexu cyklin E/CDK2 a dalšímu zajištění zástavy buněčného cyklu (Bertoli, Skotheim et al. 2013).

V inhibici buněčného cyklu zastává nezastupitelnou úlohu protein p53, jehož funkcí je především kontrola poškození genomické DNA. Jestliže dojde k narušení struktury DNA (např. v důsledku ozařování, popř. farmakologicky), aktivaci onkogenů či jiným stresovým situacím, dochází ke stabilizaci proteinu p53 a expresi řady genů, které mohou vyvolat zástavu buněčného cyklu či senescenci. Protein p53 indukuje zástavu buněčného cyklu částečně prostřednictvím exprese proteinu p21^{CIP1}, což je inhibitor CDK, který inhibuje kinázovou aktivitu komplexu cyklin E/CDK2 (Deng, Zhang et al. 1995).

V buňkách tedy existuje mnoho víceúrovňových mechanismů, které reagují na potenciálně onkogenní molekulární změny zástavou buněčného cyklu a/nebo aktivací apoptózy. Pochopení a studium těchto mechanismů je nezbytnou součástí nádorové biologie, protože jejich narušení je možné pozorovat u řady onkologických onemocnění.

4.3.2.1 Selhání kontrolních mechanismů buněčného cyklu a oprav DNA

V případě agresivních lymfoproliferací často pozorujeme selhání kontrolních mechanismů buněčného cyklu nebo zvýšení aktivity signálů stimulujících buňky k proliferaci. Příznačným příkladem je MCL s chromozomální translokací t(11;14), při níž dochází k fúzi genu *CCND1* s regulační sekvencí genu *IGH* (Bosch, Jares et al. 1994). Tato chromozomální aberace vede ke konstitutivně zvýšené expresi cyklinu D1 a stimulaci buněčného cyklu z fáze G1 do S. U MCL a ABC podtypu DLBCL lze často pozorovat bialelickou delecí genu *CDKN2A* na chromozomu 9 (9p21) (Lenz, Wright et al. 2008). Gen *CDKN2A* kóduje inhibitor cyklin-dependentních kináz p16INK4A a protein p14ARF. Protein p14ARF stabilizuje protein p53 tím, že inhibuje protein MDM2 (kontrolní dráha p14ARF-MDM2-p53-p21^{CIP1}) (Sherr 2000; Lenz, Wright et al. 2008). Protein MDM2 se váže na p53 a inhibuje tak transkripci p53 cílových genů. MDM2 je zároveň ubiquitin-ligáza, která svojí enzymatickou aktivitou připojuje jednotlivé monomery ubiquitinu na protein p53. Protein p53 je tímto molekulárně označen a degradován v proteazomu (Chene 2003). U MCL je delece této oblasti chromozomu 9 častěji nacházena u blastoidní varianty a je asociována s nepříznivou prognózou (Pinyol, Hernandez et al. 1997). Další pozorovanou aberací u B-NHL, která souvisí s regulací buněčného cyklu, je např. amplifikace genu *CDK4*. Tato genetická změna byla detekována u části DLBCL a s vysokou frekvencí se vyskytuje u MCL (Rao, Houldsworth et al. 1998; Bea, Ribas et al. 1999).

S vysokou frekvencí jsou u pacientů s B-NHL pozorovány také alterace genů, které se účastní oprav DNA, popřípadě molekulární odpovědi na poškození DNA. Gen *TP53* je jedním z nejčastěji mutovaných genů u DLBCL (Pasqualucci, Trifonov et al. 2011). Bylo zjištěno, že většina těchto mutací je lokalizována v oblastech genu kódující DNA vazebnou doménu, která je nezbytná zejména pro proteinem p53 zprostředkovanou aktivaci transkripce cílových genů (Xu-Monette, Medeiros et al. 2012). Některé práce naznačují, že mutace genu *TP53* jsou asociovány s nepříznivou prognózou pacientů, bez ohledu na molekulární podtyp DLBCL (Xu-Monette, Wu et al. 2012). Alternativním pozorovaným mechanismem ztráty funkce proteinu p53 je zvýšení exprese proteinu MDM2, která může být u DLBCL zapříčiněna např. amplifikací kódujícího genu (Rao, Houldsworth et al. 1998). Mutace vedoucí ke ztrátě funkce genu *TP53* jsou nacházeny také u MCL, kde se vyskytují přibližně u jedné pětiny případů (Greiner, Dasgupta et al. 2006; Halldorsdottir, Lundin et al. 2011). Alternativním

mechanismem ztráty genu *TP53* jsou delece 17p, které se vyskytují u části MCL případů (Halldorsdottir, Sander et al. 2011). Jedna z posledních prací studujících vliv ztráty genu *TP53* na prognózu pacientů s MCL ukazuje, že heterozygotní mutace v DNA vazebné doméně genu *TP53* jsou asociovány s nepříznivou prognózou, zatímco monoalelická delece *TP53* v důsledku ztráty 17p nikoliv (Halldorsdottir, Lundin et al. 2011). Tento překvapivý závěr lze vysvětlit dominantně negativním efektem přítomné mutace, kdy mutovaný protein p53 vytváří spolu s nemutovanými molekulami p53 tetramer s abnormální funkcí. Navíc některé typy mutací genu *TP53* dávají vzniklému proteinu nové vlastnosti, např. schopnost vázat některé další transkripční faktory, ovlivňovat jejich funkci a nepřímo tak zvyšovat rezistenci nádorových buněk k apoptóze (Olivier, Hollstein et al. 2010). Dalším u lymfoproliferací často mutovaným genem je gen *ATM* (mutated in ataxia teleangiectasia). Gen *ATM* kóduje stejnojmenný enzym, který v souhře s dalšími proteiny (p53, MDM2) zajišťuje odpověď na poškození DNA a účastní se aktivace mechanismů oprav dvouvláknových zlomů DNA. Mutace genu *ATM* jsou z lymfoproliferativních onemocnění nacházeny nejčastěji u MCL (Zhang, Jima et al. 2014). Monoalelická či bialelická ztráta genu *ATM* (delece 11q22-23) je u MCL asociována s vyšším počtem chromozomálních změn (Camacho, Hernandez et al. 2002).

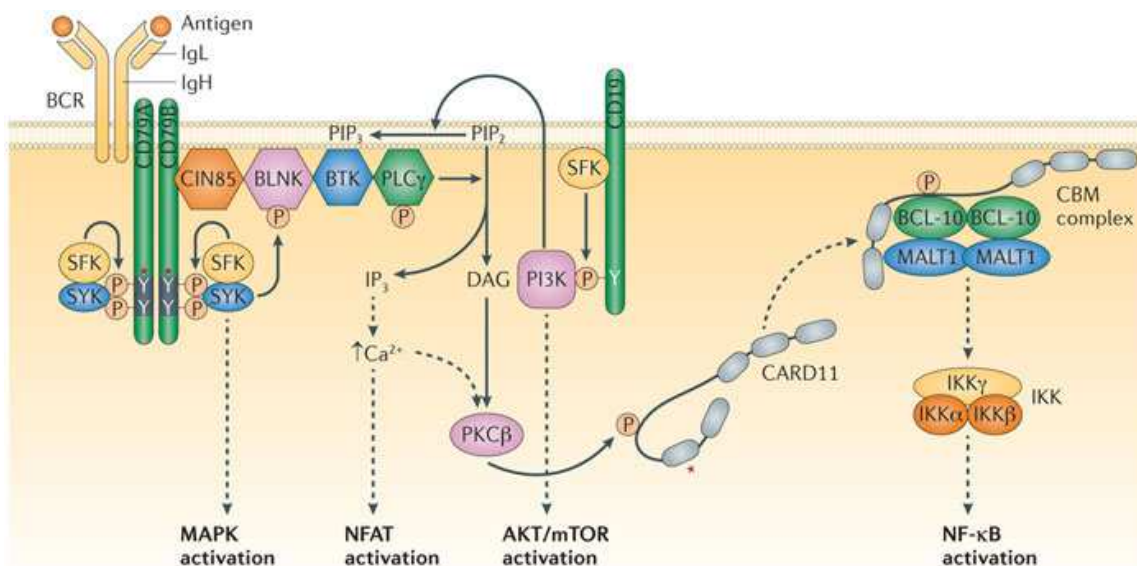
Mutace v genech regulujících buněčný cyklus často vedou k vysoké proliferační aktivitě nádorových buněk a klinicky agresivnímu průběhu onemocnění, což je typické pro DLBCL a pro většinu případů MCL (Rosenwald, Wright et al. 2003; Jardin, Jais et al. 2010). Vysoká proliferační aktivita nádorových buněk je navíc nezávislým negativním prognostickým faktorem u pacientů s MCL (Hoster, Rosenwald et al. 2016).

4.3.3 Role vybraných signálních drah v patogenezi B-nehodgkinských lymfomů

Kromě narušení regulačních mechanismů apoptózy a buněčného cyklu se v patogenezi agresivních B-NHL uplatňuje také aktivace některých signálních drah, které mohou napomáhat přežívání nádorových buněk a jejich proliferaci. Poznání konkrétních molekulárních mechanismů, které vedou k aktivaci určitých signalizačních kaskád (např. signální dráha BCR, NF κ B či PI3K/Akt/mTOR) přináší možnost zavádět cílenou léčbu, která je zaměřená na inhibici specifických molekul těchto signálních drah.

4.3.3.1 Signální dráha B buněčného receptoru

Signály přenášené do buňky cestou BCR jsou nezbytné pro vývoj a přežívání B lymfocytů (Srinivasan, Sasaki et al. 2009). BCR je umístěn v buněčné membráně a skládá se z povrchového imunoglobulinu schopného rozeznávat antigen, který je produktem V(D)J rekombinace genů kódujících jednotlivé úseky lehkého a těžkého řetězce imunoglobulinu (viz výše), a dvou koreceptorových molekul CD79a a CD79b, které zajišťují přenos signálu do buňky (Dal Porto, Gauld et al. 2004). Po vazbě antigenu na BCR dochází k agregaci receptorů v buněčné membráně a následné fosforylaci intracelulární části molekul CD79a a CD79b kinázami z rodiny Src (Lyn, Fyn, Blk). K fosforylaci dochází na tyrozinech v místě molekuly označované jako ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif). Ta představuje oblast nutnou pro vytvoření intracelulárního multiproteinového komplexu (obsahuje např. kinázu SYK), který následně aktivuje Brutonovu tyrozinkinázu (BTK) a fosfolipázu $C\gamma 2$ (PLC $\gamma 2$) (Oellerich, Bremes et al. 2011). PLC $\gamma 2$ štěpí fosfatidylinositol-4,5-bifosfát (PIP $_2$) na další signalizační molekuly (tzv. druhé posly): diacylglycerol (DAG), který zůstává vázán v cytoplasmatické membráně a fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát (PIP $_3$), který difunduje do cytosolu a stimuluje zvýšení intracelulární koncentrace kalcia. Zvýšená koncentrace DAG a intracelulárního kalcia následně aktivuje proteinkinázu C β (PKC β). PKC β fosforyluje a aktivuje řadu substrátů, např. protein CARD11 (caspase recruitment domain-containing protein 11 (viz dále)) a spouští tak množství signalizačních kaskád zahrnující PI3 kinázu, signalizaci NF κ B, ERK (extracellular-signal-regulated kinase), MAPK (mitogen activated protein kinase), RAS a NFAT (nuclear factor of activated T cells) (Gauld, Dal Porto et al. 2002; Young and Staudt 2013) viz **Obrázek 4**. Na rozdíl od této „aktivní“ formy signalizace spouštěné navázáním antigenu na BCR, existuje ještě na antigenu nezávislá, tzv. „tonická“ signalizace BCR, která je nezbytná pro přežívání B lymfocytů (Srinivasan, Sasaki et al. 2009). Tonická signalizace BCR využívá zejména kinázy z rodiny Src a kinázu SYK, která pak spouští aktivaci dráhy PI3 kinázy.



Nature Reviews | Drug Discovery

Obrázek 4: Povrchový receptor B lymfocytů (BCR) a signální dráhy, které jsou spouštěny vazbou antigenu na BCR. BLNK (B-cell linker protein), Brutonova tyrosinkináza (BTK), CARD11 (caspase recruitment domain-containing protein 11), CBM komplex (CARD11–BCL-10–MALT1), CIN85 (Cbl-interacting protein of 85 kDa), diacylglycerol (DAG), IKK (inhibitor of NF-κB kinase), těžký řetězec imunoglobulinu (IgH), lehký řetězec imunoglobulinu (IgL), inositoltrifosfát (IP₃), MALT1 (mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1), MAPK (mitogen-activated protein kinase), mTOR (mammalian target of rapamycin), nukleární faktor-κB (NF-κB), NFAT (nuclear factor of activated T cells), fosfatidylinositol-3-kináza (PI3K), fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP₂), fosfatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PIP₃), proteinkináza Cβ (PKCβ), fosfolipáza Cγ (PLCγ), kinázy z rodiny SFK, SRC. Převzato z publikace: (Young and Staudt 2013).

4.3.3.2 Signální dráha NFκB

U normálních lymfocytů je NFκB dráha přechodně aktivována antigení stimulací BCR. Jak bylo popsáno výše, navázání antigenu na BCR spouští signalizační kaskádu vedoucí k aktivaci PKCβ. PKCβ pak fosforyluje protein CARD11, který následně vytváří komplex s proteiny BCL10 (B-cell CLL/lymphoma 10) a MALT1 (mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1), tzv. CBM (CARD11-BCL10-MALT1) komplex, který zahajuje sled reakcí vedoucích k aktivaci kinázy IKK (inhibitor of kappaB kinase) která fosforyluje inhibitory NFκB a umožňuje spuštění signalizační dráhy NFκB (Rawlings, Sommer et al. 2006). NFκB je skupina příbuzných transkripčních faktorů (RelA/p65, RelB, c-Rel, NFκB1/p50 a NFκB2/p52), které ve formě homo – a heterodimerů řídí expresi cílových genů. Za normálních

okolností jsou tyto transkripční faktory inaktivovány vazbou specifických inhibitorů (IkB α , IkB β , IkB γ , IkB ϵ , Bcl-3 a prekurzorové proteiny p105, p100). Signální dráha NF κ B je spouštěna inducibilní fosforylací těchto inhibičních molekul multiproteinovým kinázovým komplexem, jak bylo popsáno výše. Tato fosforylace způsobí buď degradaci inhibiční molekuly proteazomem anebo její proteolytické štěpení vedoucí k uvolnění a přechodné aktivaci NF κ B proteinů, jejich translokaci do jádra, vazbě na promotory cílových genů a ovlivnění jejich exprese. U lymfocytů tyto cílové geny řídí řadu procesů, dochází ke stimulaci buněčného cyklu (zvýšením exprese cyklinu D1, cyklinu D2, MYC), inhibici apoptózy (např. zvýšením exprese antiapoptotického proteinu BCL-XL) a buněčné proliferaci (Jost and Ruland 2007).

4.3.3.3 Signální dráha BCR a NF κ B v patogenezi difúzního velkobuněčného B-lymfomu a lymfomu z plášťových buněk

Řada podtypů B-NHL si zachovává expresi povrchového BCR i přesto, že v průběhu jejich vzniku došlo ke specifickým chromozomálním translokacím zahrnujícím právě geny, které kódují imunoglobulinové řetězce. Vytvoření povrchového BCR u těchto podtypů B-NHL je umožněno díky zachování intaktní druhé sady genů pro IgH a IgL. Většina B-NHL pak k tvorbě BCR využívá IgM konstantní část těžkého imunoglobulinového řetězce, což je překvapivé zejména u lymfomů, které vznikají z lymfocytů germinálních center (mimo jiné i DLBCL), u kterých ve většině případů dochází k izotypovému přesmyku a náhradě konstantní části IgH – IgM za jiný izotyp (např. IgG). Možné vysvětlení preferenční exprese izotypu IgM některými lymfomy spočívá v odlišné kvalitě signálu, který skrze povrchový receptor vstupuje do buňky. Bylo prokázáno, že signalizační dráhy spouštěné různými izotypy BCR (IgM a IgG) jsou navzájem odlišné. Zatímco IgM-BCR stimuluje přežívání a proliferaci B lymfocytů prostřednictvím aktivace dráhy NF κ B, IgG-BCR napomáhá diferenciaci B lymfocytů do plazmatických buněk prostřednictvím aktivace drah MAPK a ERK (Young and Staudt 2013). Důkazem tohoto tvrzení mohou být např. různé molekulární podtypy DLBCL a jejich závislost na konkrétních signalizačních drahách. Pro ABC DLBCL, u kterého typicky nacházíme IgM-BCR, je signalizační dráha BCR tzv. "chronicky aktivní" a nezbytná pro přežívání lymfomových buněk (viz dále). Naopak GCB DLBCL typicky exprimuje receptor izotypu IgG-BCR, který je nezávislý na antigenem spouštěné signalizaci prostřednictvím BCR (Lenz, Nagel et al. 2007; Davis, Ngo et al. 2010).

Analýzou genové exprese DLBCL bylo zjištěno, že u ABC, na rozdíl od GCB podtypu DLBCL, jsou zvýšeně exprimovány geny, jejichž exprese je řízena transkripčními faktory NFκB. U ABC DLBCL buněčných liniích byla zjištěna konstitutivně zvýšená aktivita IKK, zvýšená degradace inhibitoru IκBα a zvýšená vazba transkripčních faktorů NFκB na DNA (Davis, Brown et al. 2001). Farmakologické zablokování dráhy NFκB pomocí inhibitorů IKKβ pak poukázvalo na závislost ABC DLBCL linií na této signální dráze (Lam, Davis et al. 2005). U ABC DLBCL bylo odhaleno několik mechanismů, které aktivují NFκB dráhu. Bylo zjištěno, že pro konstitutivní aktivaci dráhy NFκB je nezbytný aktivní komplex CBM, který zahajuje sled reakcí vedoucích k aktivaci IKK a spuštění signalizační dráhy NFκB (Ngo, Davis et al. 2006). Přibližně u 10 % ABC DLBCL je tento komplex aktivován v důsledku bodových mutací v genu *CARD11* (Lenz, Davis et al. 2008). Ve zbytku případů je komplex CBM aktivován právě cestou signalizační dráhy BCR. Na tento jev poprvé poukázala skupina profesora Davise. Autoři zjistili, že snížení exprese molekul tvořících BCR (IgH, Igκ, CD79A, CD79B), či molekul účastnících se jeho signalizační kaskády (BTK, SYK, BLNK, PLCγ2, PI3Kδ nebo PKCβ) selektivně zabíjí buněčné linie ABC DLBCL. Autoři tak prokázali, že signalizační kaskáda, která je za normálních okolností spouštěna navázáním antigenu na BCR, je u ABC DLBCL tzv. "chronicky aktivní" a jednotlivé molekuly BCR se v buněčné membráně ABC DLBCL shlukují obdobně, jako by byly stimulovány antigenem. Cíleným sekvenováním genů zapojených do signalizační kaskády BCR byly u 21 % ABC DLBCL detekovány bodové mutace genu *CD79b*. Mutovaná molekula *CD79b* zvyšuje expresi povrchového BCR tím, že inhibuje kinázu Lyn (Davis, Ngo et al. 2010). Kináza Lyn zajišťuje internalizaci BCR a slouží jako fyziologický zpětnovazebný inhibitor signalizace BCR (Ma, Yankee et al. 2001). NFκB dráha může být dále aktivována antigení stimulací Toll-like receptorů (TLR). U ABC DLBCL jsou často nacházeny mutace genu *MYD88*. *MYD88* je protein, který po vazbě ligandu přenáší signál z intracelulární strany TLR dále do buňky a zahajuje aktivaci dráhy NFκB. U 30 % ABC DLBCL jsou nacházeny mutace genu *MYD88*, které způsobují aktivaci NFκB dráhy nezávisle na stimulaci TLR (Ngo, Young et al. 2011).

Aktivace signální dráhy NFκB hraje roli také v patogenezi MCL a byla popsána jak u buněčných linií, tak u pacientů s MCL. Studium genové exprese MCL ukázalo zvýšenou expresi NFκB cílových genů (např. antiapoptotických molekul *BCL2*, *BCL-XL*, *XIAP* a *cFLIP* (cellular FLICE (FADD-like IL-1β-converting enzyme) -like

inhibitory protein) (Martinez, Camacho et al. 2003). Dále bylo zjištěno, že aktivace dráhy NFκB zvyšuje expresi proteinu BLyS (B lymphocyte Stimulator), což je molekula z rodiny TNF, která po vazbě na své receptory reguluje přežívání, diferenciaci a proliferaci B lymfocytů. Protein BLyS navíc aktivuje dráhu NFκB a jeho zvýšená exprese tak představuje pozitivní zpětnovazebnou smyčku, která stimuluje přežívání a proliferaci nádorových buněk (Fu, Lin-Lee et al. 2006).

4.3.3.4 Inhibice signální dráhy BCR a NFκB

Brutonova tyrozinkináza je klíčovou molekulou tzv. aktivní formy signalizace BCR, která je spouštěna navázáním antigenu na tento receptor (viz výše). Ibrutinib je specifický inhibitor BTK (Winer, Ingham et al. 2012) jehož podávání je racionální u lymfomů, u nichž je dráha NFκB chronicky aktivní. Monoterapie ibrutinibem je schválena u pacientů s relabujícím MCL (Wang, Rule et al. 2013). Ibrutinib je v současné době testován v klinické studii fáze III u pacientů s non-GCB DLBCL. V této randomizované studii bude srovnána efektivita a bezpečnost podávání ibrutinibu v kombinaci s chemoterapií R-CHOP vůči samotné chemoterapii R-CHOP (nepublikováno).

NFκB signální dráhu lze blokovat také nepřímo prostřednictvím inhibitorů proteazomu. Bortezomib je reverzibilní inhibitor proteazomu, jehož protinádorový účinek je pravděpodobně dán zablokováním degradace molekuly IκBα proteazomem, což vede k inhibici signální dráhy NFκB (Strauss, Higginbottom et al. 2007). Účinnost bortezomibu v kombinaci s imunochemoterapií v léčbě ABC DLBCL byla prokázána v několika klinických studiích (Dunleavy, Pittaluga et al. 2009; Ruan, Martin et al. 2011). Bortezomib je schváleným lékem pro pacienty s relapsem MCL a v kombinaci s imunochemoterapií byl testován také u pacientů s nově diagnostikovaným MCL (Romaguera, Fayad et al. 2010).

4.3.3.5 PI3K/AKT/mTOR signální dráha

Další významnou signální drahou, která může být nadměrně aktivní u některých typů B-NHL je PI3K/AKT/mTOR. Tato velice komplexní signální kaskáda reaguje na mitogenní stimuly z extracelulárního prostředí a řídí přežívání buněk a jejich proliferaci, ale také buněčnou motilitu, invazivitu či novotvorbu cév. Apikální molekulou této signální dráhy je lipidová kináza PI3K. Byly popsány tři třídy PI3K, které jsou kódovány odlišnými geny a liší se svou strukturou i funkcí. Dále budou popisovány

pouze PI3K třídy IA, které jsou významné pro nádorová onemocnění včetně B-NHL. PI3K (třídy IA) může být aktivována prostřednictvím receptorů spřažených s G proteiny či receptorovými tyrozinkinázami (aktivovaných cytokiny a růstovými faktory z extracelulárního prostředí). Aktivní PI3K katalyzuje fosforylaci fosfatidylinozitol-4,5-bifosfátu (PIP2) a vede ke vzniku tzv. druhého posla fosfatidylinozitol-3,4,5-trifosfátu (PIP3). PIP3 je integrální součástí buněčné membrány a reaguje s takovými proteiny, které ve své struktuře obsahují tzv. PH (plecstrin homology) doménu. Tyto proteiny jsou pak ukotveny prostřednictvím svých PH domén k PIP3, respektive k buněčné membráně a mohou být aktivovány. Jedním z takových proteinů je serin-threoninová kináza AKT (Vivanco and Sawyers 2002). Hlavními důsledky aktivace kinázy AKT je stimulace přežívání buněk, jejich proliferace a novotvorba cév. Některé z mechanismů, kterými kináza AKT řídí tyto procesy jsou popsány dále. AKT například fosforyluje a tím inhibuje funkci proapoptotického proteinu BAD. AKT zabraňuje degradaci cyklinu D1 a transkripčního faktoru MYC inhibicí kinázy GSK3 (glycogen synthase kinase-3). GSK3 kináza za normálních okolností fosforyluje cyklin D1 a MYC, které jsou po fosforylaci ubiquitinovány a následně degradovány proteazomem (Cohen and Frame 2001). AKT dále řídí přežívání buněk nepřímo aktivací signální dráhy NFκB. AKT spouští NFκB signální dráhu tím, že fosforyluje a aktivuje IKK. Kináza IKK následně inaktivuje IκB inhibiční molekuly a umožňuje transkripčním faktorům rodiny NFκB translokovat do jádra (viz výše) (Romashkova and Makarov 1999). AKT může také ovlivňovat funkce proteinu p53 prostřednictvím fosforylace molekuly MDM2 (inhibitor proteinu p53, viz výše). Některé práce naznačují, že fosforylace proteinu MDM2 umožňuje jeho snazší translokaci do jádra, kde váže protein p53 a tím inhibuje jeho transkripční aktivity, popřípadě řídí jeho ubiquitinaci a degradaci v proteazomu (Mayo and Donner 2001). Důležitou cílovou molekulou kinázy AKT je proteinkináza mTOR. mTOR se nachází ve dvou odlišných proteinových komplexech: mTORC1 (mTOR complex 1) a mTORC2 (mTOR complex 2). mTORC1 komplex je citlivý na inhibici rapamycinem a jeho aktivace reguluje prostřednictvím kinázy p70^{S6} a proteinu 4E-BP1 (4E-binding protein 1) translaci proteinů, které umožňují přechod z G1 do S fáze buněčného cyklu (např. cyklin D1) (Takuwa, Fukui et al. 1999). mTORC2 komplex je schopen aktivovat kinázu AKT a podílí se na reorganizaci cytoskeletu (Ma and Blenis 2009).

4.3.3.6 Role PI3K/AKT/mTOR signální dráhy v patogenezi difúzního velkobuněčného B lymfomu a lymfomu z plášťových buněk

U GCB DLBCL je PI3K/AKT/mTOR signální dráha konstitutivně aktivní v důsledku ztráty tumor supresorového genu *PTEN*. *PTEN* je fosfatáza, která konvertuje PIP_3 na PIP_2 a funguje jako centrální negativní regulátor PI3K/AKT signální dráhy. U více než 50 % GCB DLBCL není *PTEN* detekovatelný na úrovni proteinu (Pfeifer, Grau et al. 2013). U menší části případů je detekována delece genu *PTEN* na chromozomu 10q23 nebo somatická mutace genu (Lenz, Wright et al. 2008; Pfeifer, Grau et al. 2013). Hlavním mechanismem snížení exprese genu *PTEN* je jeho transkripční inhibice způsobená některými miRNA (miRNA 17-92, miRNA-21) (Lenz, Wright et al. 2008). Popsané mechanismy vedoucí ke snížení exprese proteinu *PTEN* jsou typické pro GCB DLBCL a způsobují dependenci tohoto podtypu DLBCL na PI3K/AKT/mTOR signální dráze (Pfeifer, Grau et al. 2013). U MCL bývá nacházená vysoká úroveň aktivní kinázy AKT, mTOR a jejich cílových molekul (Rizzatti, Falcao et al. 2005). Existuje několik mechanismů, které se podílí na konstitutivní aktivaci kinázy AKT u MCL. Podobně jako u DLBCL, je u MCL pozorováno časté zvýšení exprese miRNA 17-92 vedoucí k transkripční inhibici fosfatázy *PTEN* (Navarro, Bea et al. 2009). Dalším mechanismem aberantní aktivace této dráhy je amplifikace genu *PIK3CA*, který kóduje p110 α izoformu PI3K. Bylo zjištěno, že nadpočetný počet kopií genu *PIK3CA* pozitivně koreluje s expresí mRNA *PIK3CA* a fosforylací kinázy AKT. Inhibice *PIK3CA* pak způsobovala apoptózu buněčných linií s nadpočetným počtem kopií genu *PIK3CA* (Psyrris, Papageorgiou et al. 2009).

4.3.3.7 Inhibice PI3K/AKT/mTOR signální dráhy

Inhibice signální dráhy PI3K/Akt/mTOR je racionální zejména u těch lymfoproliferativních onemocnění, pro něž je nezbytná tonická či aktivní signalizace BCR, které obě vedou mimo jiné k aktivaci PI3K. Řada látek, které inhibují PI3K/Akt/mTOR signální dráhu na různých úrovních je preklinicky testována a některé z nich jsou již používány k léčbě pacientů s lymfoproliferativními onemocněními. Jednu z terapeutických možností představují inhibitory PI3K. Inhibitory PI3K mohou působit nespecificky proti všem PI3K (např. látka LY294002) nebo mohou být cíleny proti specifické izoformě PI3K jako např. idelalisib, který cílí na izoformu p110 δ (Lannutti, Meadows et al. 2011). Idelalisib je testován v klinických studiích u pacientů s MCL a

DLBCL (Health 2016). Do klinického použití se dostaly dále inhibitory molekuly mTOR jako temsirolimus. Temsirolimus inhibuje některé funkce proteinového komplexu mTORC1 a mechanismem jeho protinádorového účinku je zástava buněčného cyklu v G0/G1 fázi pravděpodobně aktivací kinázy GSK3 a následnou zvýšenou degradací cyklinu D1 (Dal Col, Zancai et al. 2008). Temsirolimus je schváleným lékem pro léčbu pacientů s relabujícím MCL (Hess, Herbrecht et al. 2009).

4.4 Terapie B-nehodgkinských lymfomů

Pro současný vývoj nových léčebných strategií lymfoproliferativních onemocnění je klíčový výzkum patogeneze těchto onemocnění, který následně umožňuje cíleně zasahovat a inhibovat onkogenní mechanismy, které se u jednotlivých typů leukémií/lymfomů uplatňují. Historicky však lze terapii lymfoproliferativních onemocnění rozdělit do několika etap. Významným krokem vpřed bylo objevení konvenčních cytostatik, tedy látek, které u nádorových buněk různými mechanismy znemožňují syntézu nukleových kyselin, inhibují proliferaci a vedou k apoptóze buněk např. indukci proteinu p53 (Klener 2013). Většina cytostatik byla objevena mezi roky 1946-1970 a jejich použití v monoterapii představuje první stupeň v léčbě lymfoproliferativních onemocnění. Toto období bylo následováno obdobím kombinované chemoterapie, přičemž některé režimy objevené v 80. letech 20. století jsou používány dodnes (Gottlieb, Gutterman et al. 1973; Bonadonna, Zucali et al. 1975). Dalším předělem v léčbě B-NHL bylo zavedení imunoterapie monoklonálními protilátkami. Monoklonální chimerická protilátka Rituximab, která specificky rozeznává marker B lymfocytů, povrchový antigen CD20, byla poprvé testována v roce 1994 u pacientů s relabujícím B-NHL (Maloney, Liles et al. 1994). Na základě pozitivních výsledků řady klinických studií se rituximab stal standardní součástí kombinované immunochemoterapie u většiny B-NHL (Coiffier, Lepage et al. 2002; Hiddemann, Kneba et al. 2005; Sehn, Donaldson et al. 2005). Současná éra tzv. „nových léků“ se opírá o poznání biologie jednotlivých onemocnění na molekulární úrovni. Nové léky jsou často cílené proti konkrétním molekulám intracelulárních signalizačních kaskád, které mohou být u různých typů lymfoproliferativních onemocnění nadměrně aktivovány. Tato nadměrná aktivace může vést v konečném důsledku ke stimulaci proliferace, inhibici apoptózy či ovlivnění interakcí maligních buněk s nádorovým mikroprostředím.

4.4.1 Terapie difúzního velkobuněčného B-lymfomu

DLBCL patří mezi agresivní B-NHL a v současné době lze kombinovanou imunochemoterapií vyléčit více než 50 % pacientů s tímto onemocněním. Kombinovaná imunochemoterapie R-CHOP je standardní terapií pro pacienty s nově diagnostikovaným DLBCL. V roce 1993 byly publikovány výsledky randomizované klinické studie fáze III, v níž byla srovnána účinnost chemoterapie CHOP s intenzivnějšími antracyklinovými režimy u 899 pacientů s agresivními NHL. Mezi jednotlivými léčebnými rameny nebyly významné rozdíly v dosažení odpovědi na léčbu či celkovém přežití pacientů, avšak s menší toxicitou chemoterapie CHOP oproti intenzivním antracyklinovým režimům (Fisher, Gaynor et al. 1993). Významným předělem v léčbě DLBCL bylo zavedení rituximabu. První studie, která poukázala na účinnost rituximabu byla randomizovaná studie srovnávající R-CHOP vs. CHOP u celkem 399 pacientů s nově diagnostikovaným DLBCL. V rameni s rituximabem (R-CHOP) bylo dosaženo statisticky významně vyšší procento kompletních remisí oproti samotné terapii CHOP a 2-leté i 10-leté přežití bez progresu bylo rovněž lepší u pacientů, kteří byli léčeni chemoterapií R-CHOP (Coiffier, Lepage et al. 2002; Coiffier, Thieblemont et al. 2010). Přibližně u jedné třetiny pacientů dochází po primoterapii k relapsu onemocnění. Tito pacienti jsou pak indikováni k záchranné chemoterapii a konsolidaci vysokodávkovanou chemoterapií s autologní transplantací kmenových buněk (ASCT, autologous stem cell transplantation) (Gisselbrecht, Glass et al. 2010). V rámci klinických studií byly a jsou testovány látky (popsané výše v rámci jednotlivých kapitol) cílící na antiapoptotické proteiny (ABT-199), signalizační dráhy (ibrutinib, idelalisib, temsirolimus) či inhibici proteazomu (bortezomib).

4.4.2 Terapie lymfomu z pláštěvých buněk

MCL je agresivní B-NHL s nepříznivou prognózou. V minulosti byla terapie tohoto onemocnění založená na kombinaci antracyklinů a alkylačních látek, zejména chemoterapeutickém režimu CHOP. V posledních letech však byly zavedeny nové přístupy v léčbě tohoto onemocnění, které významně přispěly k prodloužení celkového přežití pacientů s MCL. Zejména přidání rituximabu, použití intenzivních chemoterapeutických režimů, jejichž součástí je HDAC a konsolidace vysokodávkovanou chemoterapií s ASCT zlepšilo prognózu pacientů s MCL (Khoury, Romaguera et al. 1998; Dreyling, Lenz et al. 2005; Romaguera, Fayad et al. 2005). I

přes navození léčebné odpovědi však u většiny pacientů dochází k relapsu onemocnění. V současné době neexistuje standardní léčba pro pacienty s relapsem MCL. K dispozici jsou chemoterapeutické režimy s cytostatiky jako je cisplatina, fludarabin, gemcitabin nebo bendamustin. Klinicky testovány či schváleny jsou také léky ovlivňující nádorové mikroprostředí (lenalidomide), látky inhibující některé aberantně aktivované signální dráhy (temsirolimus, ibrutinib) či inhibitory proteazomu (bortezomib), viz výše.

4.4.3 Cytarabin v léčbě lymfomu z pláštěvých buněk

Cytarabin patří do skupiny antinukleotidů, purinových a pyrimidinových analogů. Cytarabin (1- β -D-arabinofuranosylcytosin) je strukturální analog deoxycytidinu a jeho transport do buněk závisí na dosažené plazmatické koncentraci (Gati, Paterson et al. 1997). Při použití standardních dávek cytarabinu (100-200 mg/m²) je dosažená koncentrace cytarabinu v rozmezí 0.5-1 μ M a cytarabin je transportován do buňky pomocí přenašečů hENT1 a hENT2 (human equilibrative nucleoside transporter 1/2). Po podání HDAC (2-3g/m²) je dosažená plazmatická koncentrace cytarabinu mnohonásobně vyšší (50 μ M) a cytarabin vstupuje do buňky zejména prostou difúzí na základě koncentračního gradientu. Po vstupu do buněk je cytarabin fosforylován a aktivován klíčovým enzymem, DCK na cytarabinmonofosfát (ara-CMP). Následně dochází sledem reakcí a za účasti dalších dvou kináz k fosforylaci ara-CMP na cytarabintrifosfát (ara-CTP). Ara-CTP vstupuje do jádra a stává se substrátem DNA-polymeráz, které zajišťují replikaci DNA. Inkorporací ara-CTP do nově vznikající DNA dochází k zástavě replikace DNA a spuštění mechanismů, které vedou k zástavě buněčného cyklu a pokusům o opravy DNA a/nebo buněčné smrti (Galmarini, Mackey et al. 2001). Účinnost HDAC jako součásti indukčních chemoterapeutických režimů v léčbě MCL byla prokázána v několika klinických studiích (Lefrere, Delmer et al. 2002; Romaguera, Fayad et al. 2005). V roce 2002 Lefrere et al publikovali výsledky prospektivní klinické studie, v níž byli pacienti s nově diagnostikovaným MCL léčeni 4 cykly chemoterapie CHOP a následně režimem DHAP (dexamethazon, cisplatina, HDAC), pokud nebylo režimem CHOP dosaženo kompletní remise onemocnění. Pouze 7 % pacientů dosáhlo po 4 cyklech CHOP kompletní remise onemocnění. U zbylých 93 % pacientů, kteří dosáhli buď parciální remise onemocnění (50%) nebo stabilního onemocnění (43%), byl indikován režim DHAP, který následně vedl k dosažení kompletní remise u 84 % pacientů (Lefrere, Delmer et al. 2002). Randomizovaná klinická studie Evropské skupiny pro MCL (European Mantle Cell Lymphoma

Network) prokázala, že alternace režimu R-CHOP s R-DHAP významně zvyšuje počet kompletních remisí a zlepšuje celkové přežití pacientů s MCL ve srovnání s chemoterapií R-CHOP (Delarue, Haioun et al. 2013). Na základě výsledků těchto studií se HDAC stal standardní součástí indukční terapie u mladších pacientů s nově diagnostikovaným MCL.

5 VÝCHODISKO PRO FORMULOVÁNÍ VÝZKUMNÝCH CÍLŮ A HYPOTÉZ

Agresivní B-NHL představují heterogenní skupinu vzácných hematologických malignit vznikajících nádorovou transformací tzv. periferních lymfocytů v průběhu jejich diferenciaci v sekundárních lymfatických orgánech. Prognóza pacientů s B-NHL doznala v posledních desetiletích zásadního zlepšení, kdy původně nevléčitelné agresivní malignity lze pomocí kombinovaných imunochemoterapeutických režimů ve vysokém procentu případů zcela vyléčit. Toto zlepšení prognózy (zcela ojedinělé v rámci onkologických onemocnění) bylo možné mimo jiné díky významnému prohloubení poznání patofyziologie B-NHL a díky preklinickému, klinickému a translačnímu výzkumu.

Hlavní pilíře preklinického výzkumu představují etablované buněčné linie a *in vitro* výzkum s pomocí těchto linií, a dále *in vivo* modely, nejčastěji myší modely B-NHL. Kromě myších modelů myších lymfomů se v posledních několika letech zavádějí a standardizují myší modely založené na xenotransplantaci lidských primárních buněk (tj. buněk odebraných přímo pacientovi) do imunodeficitních myší, nejčastěji tzv. NSG (NOD-SCID-gamma) myši. Takové modely se nazývají „patient-derived xenografts“ (PDX) a představují zásadní přiblížení preklinického výzkumu situaci u pacienta. Translační výzkum se snaží integrovat poznatky získané v laboratoři s možnou aplikací do kliniky („from bench to bed-site“), a naopak analýzou primárních buněk, tkáně či tělních tekutin pacienta prohlubovat informace o biologii lymfomů, prognóze konkrétních pacientů či predikci citlivosti daného typu lymfomu u daného pacienta na vybrané protinádorové látky.

Disertační práce se zabývá problematikou agresivních B-NHL a to konkrétně (1) zavedením a charakterizací nových myších modelů využitelných pro preklinický a translační výzkum a (2) identifikaci molekulárních mechanismů predikujících citlivost či rezistenci B-NHL vůči vybraným protilymfomovým látkám.

6 CÍLE

Cíl 1A: Zavést a charakterizovat myší model lidského MCL pomocí xenotransplantace ustálených linií a primárních buněk MCL do imunodeficitních myší. Objasnit vliv *in vivo* prostředí na genovou expresi MCL buněk a jejich senzitivitu k vybraným cytotoxickým látkám. Otestovat využití myšího modelu lidského MCL pro experimentální terapii.

Hypotéza: Primární buňky izolované od pacientů s MCL jsou schopné přijetí v imunodeficitních myších obdobně jako ustálené buněčné linie. Xenotransplantované lymfomové buňky (PDX buňky) budou plně závislé na mikroprostředí myších tkání a nebudou schopny přežít v podmínkách *ex vivo* / *in vitro* podobně jako primární lymfomové buňky.

Cíl 1B: Na myších modelech lidského MCL experimentálně otestovat, které ze tří léčebných ramen zahrnujících cisplatinu, cytarabin a kombinaci obou látek (v ekvitoxických dávkách) vykazuje nejlepší protilymfomový účinek.

Hypotéza: Cisplatina představuje klíčovou komponentu chemoterapeutického režimu DHAP. Její vynechání (tj. léčba založená pouze na vysokodávkovaném cytarabinu) způsobí nedostatečnou eliminaci lymfomových buněk a tudíž selhání léčby, zejména u agresivních forem MCL.

Cíl 2A: Studovat význam antiapoptotických proteinů rodiny BCL2 (BCL2, MCL1 a BCL-XL) pro přežívání buněk DLBCL. Objasnit, zda je terapie cílená na inhibici antiapoptotických proteinů využitelná u pacientů s DLBCL. Definovat podskupinu pacientů s DLBCL, kteří budou nejvíce profitovat z této léčebné strategie.

Hypotéza: DLBCL je z hlediska závislosti na antiapoptotických proteinech heterogenní skupinou lymfomů. Minimálně ta část DLBCL pacientů, kterým chybí exprese BCL2 proteinu, bude rezistentní na protilymfomový lék venetoclax.

Cíl 2B: Identifikace molekulárních mechanismů zodpovědných za získanou rezistenci MCL buněk k cytarabinu. Empirický screen cytarabin-rezistentních MCL buněk na panelu vybraných protilymfomových látek za účelem optimální protilymfomové léčby pacientů, u kterých dojde k návratu lymfomu po selhání cytarabinu.

Hypotéza: Rezistence na cytarabin bude spojena se změnami exprese buněčných transporterů cytarabinu a / nebo se změnou exprese enzymů, které metabolizují cytarabin na aktivní protilymfomovou látku. Mechanismus rezistence na cytarabin bude možné cíleně ověřit u pacientů s MCL, kteří prodělali relaps po selhání cytarabinu. Poznání mechanismu rezistence na cytarabin umožní lépe zacílit výběr vhodné léčby cytarabin-rezistentních forem MCL.

Výsledky řešení jednotlivých cílů byly zveřejněny ve čtyřech publikacích, které jsou součástí dizertační práce (kapitola 8: Výsledky).

7 METODY

Níže uvedený seznam představuje metody použité ve čtyřech publikacích, které jsou podkladem dizertační práce. Detailní popis konkrétních metod a další informace (experimentální léčiva, buněčné linie, imunodeficitní myši) jsou uvedeny v jednotlivých publikacích v sekci „Materiály a metody“.

- Analýza genové exprese pomocí expresních čipů (Illumina HumanRef BeadChips)
- Měření apoptózy buněk pomocí Annexinu V
- Dvourozměrná gelová elektroforéza proteinů
- Elektroforéza proteinů v polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným, westernový přenos a imunodetekce
- Hmotnostní spektrofotometrie
- Imunohistochemická analýza
- In vivo experimenty (xenotransplantace nádorových buněk, experimentální terapie) s použitím imunodeficitních myší (kmen: NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ)
- Konstitutivní zvýšení / snížení exprese antiapoptotických proteinů u vybraných buněčných linií pomocí transdukce připravených lentivirů
- Kultivace buněčných linií in vitro
- Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (PCR v reálném čase)
- Testy cytotoxicity založené na uvolňování radioaktivního chromu (⁵¹Cr release assay) pro detekci protilátkami či komplementem zprostředkované cytotoxicity
- Měření proliferační aktivity buněk (WST-8 cell proliferation assay kit)
- Proteinová imunoprecipitace
- Průtoková cytometrie
- Statistická analýza

8 VÝSLEDKY

Výsledky jsou předkládány ve formě čtyř prvoautorských publikací týkajících se experimentální terapie B-nehodgkinských lymfomů. Každá z uvedených publikací je samostatně diskutována v kontextu současné literatury.

Publikace číslo 1:

Klanova M, Soukup T, Jaksá R, Molinsky J, Lateckova L, Maswabi BC, Prukova D, Brezinova J, Michalova K, Vockova P, Hernandez-Ilizaliturri F, Kulvait V, Zivny J, Vokurka M, Necas E, Trneny M, Klener P. *Mouse models of mantle cell lymphoma, complex changes in gene expression and phenotype of engrafted MCL cells: implications for preclinical research*. Lab Invest. 2014 Jul;94(7):806-17.

Publikace číslo 2:

Klanova M, Soukup T, Molinsky J, Lateckova L, Vockova P, Alam M, Zivny J, Trneny M, Klener P. *Single-agent cytarabine is insufficient for the treatment of human mantle cell lymphoma in mouse xenograft model*. Neoplasma. 2016;63(5):774-8.

Publikace číslo 3:

Klanova M, Andera L, Brazina J, Svadlenka J, Benesova S, Soukup J, Prukova D, Vejmelkova D, Jaksá R, Helman K, Vockova P, Lateckova L, Molinsky J, Maswabi BC, Alam M, Kodet R, Pytlik R, Trneny M, Klener P. *Targeting of BCL2 Family Proteins with ABT-199 and Homoharringtonine Reveals BCL2- and MCL1-Dependent Subgroups of Diffuse Large B-Cell Lymphoma*. Clin Cancer Res. 2016 Mar 1;22(5):1138-49.

Práce získala cenu České hematologické společnosti za nejlepší publikaci v roce 2015.

Publikace číslo 4:

Klanova M, Lorkova L, Vit O, Maswabi B, Molinsky J, Pospisilova J, Vockova P, Mavis C, Lateckova L, Kulvait V, Vejmelkova D, Jaksá R, Hernandez F, Trneny M, Vokurka M, Petrak J, Klener P Jr. *Downregulation of deoxycytidine kinase in cytarabine-resistant mantle cell lymphoma cells confers cross-resistance to nucleoside analogs gemcitabine, fludarabine and cladribine, but not to other classes of anti-lymphoma agents*. Mol Cancer. 2014 Jun 27;13:159.

8.1 Publikace číslo 1

Laboratory Investigation (2014) 94, 806–817
© 2014 LSCAP, Inc. All rights reserved 0021-6837/14

Mouse models of mantle cell lymphoma, complex changes in gene expression and phenotype of engrafted MCL cells: implications for preclinical research

Magdalena Klanova^{1,2}, Tomas Soukup³, Radek Jaksá⁴, Jan Mollinsky^{1,2}, Lucie Lateckova^{1,2}, Bokang CL Maswabi¹, Dana Prukova¹, Jana Brezinova⁵, Kyra Michalova⁵, Petra Vockova^{1,2}, Francisco Hernandez-Ilizaliturri⁶, Vojtech Kulvait¹, Jan Zivny¹, Martin Vokurka¹, Emanuel Necas¹, Marek Tmeny^{2,5} and Pavel Klener^{1,2}

Mantle cell lymphoma (MCL) is an aggressive type of B-cell non-Hodgkin lymphoma (NHL) associated with poor prognosis. Animal models of MCL are scarce. We established and characterized various *in vivo* models of metastatic human MCL by tail vein injection of either primary cells isolated from patients with MCL or established MCL cell lines (Jeko-1, Mino, Rec-1, Hbl-2, and Granta-519) into immunodeficient NOD.Cg-Prkdc^{cid} Il2rg^{tm1Wjl/SzJ} mice. MCL infiltration was assessed with immunohistochemistry (tissues) and flow cytometry (peripheral blood). Engraftment of primary MCL cells was observed in 7 out of 12 patient samples. The pattern of engraftment of primary MCL cells varied from isolated involvement of the spleen to multiorgan infiltration. On the other hand, tumor engraftment was achieved in all five MCL cell lines used and lymphoma involvement of murine bone marrow, spleen, liver, and brain was observed. Overall survival of xenografted mice ranged from 22 ± 1 to 54 ± 3 days depending on the cell line used. Subsequently, we compared the gene expression profile (GEP) and phenotype of the engrafted MCL cells compared with the original *in vitro* growing cell lines (controls). We demonstrated that engrafted MCL cells displayed complex changes of GEP, protein expression, and sensitivity to cytotoxic agents when compared with controls. We further demonstrated that our MCL mouse models could be used to test the therapeutic activity of systemic chemotherapy, monoclonal antibodies, or angiogenesis inhibitors. The characterization of MCL murine models is likely to aid in improving our knowledge in the disease biology and to assist scientists in the preclinical and clinical development of novel agents in relapsed/refractory MCL patients.

Laboratory Investigation (2014) 94, 806–817; doi:10.1038/labinvest.2014.61; published online 26 May 2014

KEYWORDS: experimental therapy; immunodeficient mice; lymphoma microenvironment; mantle cell lymphoma; mouse xenograft model

Mantle cell lymphoma (MCL) is an aggressive type of B-cell non-Hodgkin lymphoma (NHL) characterized by the chromosomal translocation t(11;14)(q13;q32) leading to overexpression of cyclin D1.¹ Apart from this canonical aberration, MCL may harbor a large number of recurrent cytogenetic changes that further deregulate cell cycle machinery (for example, deletion of 9p21 (CDKN2A) and amplification of 12q13 (CDK4)) or interfere with cellular response to DNA damage (for example, alterations of 11q22-q23 (ATM), 17p13 (TP53)

and overexpression of MDM2).^{2–5} MCL is associated with poor prognosis.^{6,7} In order to improve the outcome of MCL patients, the rational development and preclinical/clinical testing of new agents are necessary. Reliable and reproducible *in vivo* models of MCL are thus urgently needed. *In vivo* models have several advantages over *in vitro* approaches. For example, they enable the study of MCL biology in its microenvironment, including engraftment, growth rate, spread patterns, or tumor associated neovascularization.

¹First Faculty of Medicine, Institute of Pathological Physiology, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic; ²First Department of Medicine, Clinical Department of Hematology of the General University Hospital, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic; ³Medical Faculty Hradec Králové, Institute of Histology and Embryology, Charles University, Prague, Czech Republic; ⁴First Faculty of Medicine, Institute of Pathology, Charles University in Prague; ⁵Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic and ⁶Department of Medical Oncology and Immunology, Cancer Cell Center, Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, NY, USA

Correspondence: Dr M Klanova, MD, First Faculty of Medicine, Institute of Pathological Physiology, Charles University in Prague, U Nemocnice 5, Prague 2, 12853, Czech Republic.

E-mail: magdalena.klanova@seznam.cz

Received 20 September 2013; revised 24 March 2014; accepted 28 March 2014

In addition, *in vivo* models are preferable for the testing of agents that cannot be reliably tested *in vitro* (for example, monoclonal antibodies, immunomodulatory drugs, prodrugs, inhibitors of B-cell receptor signaling, or inhibitors of angiogenesis). Mouse models of MCL reported in the literature include two large groups: (1) genetically engineered mice predisposed to develop a MCL-like disease and (2) immunodeficient mice capable of bearing human MCL xenografts.^{8–11} Recently, characterization of a mouse xenograft model using primary MCL cells was reported; however, it was unfortunately technically demanding and difficult to implement.¹¹ Currently, the most widely used MCL xenograft model utilizes the subcutaneous injection of established MCL cell lines into immunodeficient mice.^{12–15}

To further improve on the current available MCL mouse models, we established and characterized several reproducible metastatic mouse models of human MCL by the inoculation of human primary MCL cells or MCL cell lines (Jeko-1, Mino, Rec-1, Granta-519, and Hbl-2) via tail vein injection (*i.v.*) into immunodeficient mice NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (non-obese diabetic, interleukin-2 receptor gamma common chain null), commonly referred to as NOD-SCID-gamma (NSG) mice. We demonstrated that MCL cells obtained *ex vivo* from various infiltrated murine organs displayed distinct changes in gene expression profile (GEP), immunophenotype, and sensitivity to cytotoxic agents compared with *in vitro* growing MCL cells. Our findings suggest that engraftment of MCL cells into immunodeficient mice leads to clonal selection and illustrate the complex interaction between lymphoma cells and its host. Moreover, given the different responses to standard chemotherapy agents observed between MCL cells and MCL isolated following *in vivo* engraftment our work further stress the need to use both *in vitro* and *in vivo* preclinical models in the evaluation of novel agents for B-cell lymphoma patients.

MATERIALS AND METHODS

MCL Cell Lines

MCL cell lines Jeko-1, Rec-1, and Granta-519 were obtained from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ). The Mino cell line was obtained from American Tissue Culture Collection (ATCC), and the Hbl-2 cell line was a kind gift from Professor Martin Dreyling (University of Munich, Munich, Germany).

Primary MCL Cells

Primary MCL cells were obtained from the peripheral blood, bone marrow (BM), lymph node, or pleural effusion of MCL patients. Mononuclear cells were isolated by the standard Ficoll-Hypaque gradient centrifugation, and frozen in heat inactivated fetal bovine serum supplemented with 10% dimethyl sulfoxide (DMSO).

Samples were obtained after informed consent according to the Declaration of Helsinki. This work was approved by

the Ethics committee of the General University Hospital in Prague.

Immunodeficient Mice

The NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ mice (referred to as NSG mice) were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA). All animals were housed and maintained in a pathogen-free environment in individually ventilated cages and provided with sterilized food and water. The experimental design was approved by the institutional animal care and use committee.

Xenograft Experiments Using Primary MCL Cells

Eight- to twelve-week-old female NSG mice were used for all experiments. On day 1 the mice were sublethally irradiated (2.5 Gy) and subsequently inoculated via tail vein injection with freshly thawed primary MCL cells ($10\text{--}80 \times 10^6$). Upon the development of hind-leg paralysis or generalized inability to thrive, animals were euthanized by cervical dislocation. Mice that showed no signs of lymphoma engraftment were killed 60 days following tumor cell inoculation. Selected murine organs were subjected to immunohistochemical (IHC) analysis to assess organ infiltration with human cells (see in detail further).

Xenograft Experiments Using MCL Cell Lines

The mice were injected with 1×10^6 MCL cells (Granta-519, Hbl-2, and Jeko-1) or 10×10^6 MCL cells (Rec-1 and Mino) via tail vein injection. Two animals from each cohort were killed at four different time points (designated T1, T2, T3, and T4). T1 was set as the midpoint between the day of tumor inoculation (Day 0) and the estimated overall survival (OS). OS was defined as the time between tumor cell inoculation (Day 0) and the time of development of limb paralysis (T4). T2 and T3 were set in between of the T1 and T4 time points so that they represented one-third and two-thirds of the interval between T1 and T4, respectively. At T4 time point, peripheral blood samples were collected following anesthesia with ketamine-xylazine by retro-orbital exsanguination and before euthanasia. Then, red cells were lysed using a lysis buffer (BioLegend, USA) and the samples were submitted to flow cytometric analysis (see section Flow cytometry analysis).

IHC Analysis

Once the animals reached T4, necropsy studies were performed. Murine organs were removed, fixed in 4% formalin for 7 days, cut into tissue blocks, embedded in paraffin, and sectioned into transversal and longitudinal 6–7 μm thick slices. Sections were stained with hematoxylin and eosin, Masson's blue trichrome, and Gomori impregnation.¹⁶ IHC staining for human CD45 (2B11, PD7/26), CD20 (L26), cyclin D1 (DSC-6), Ki-67/MIB1 (DakoCytomation), and CD3 (SP7) (Neomarkers) was performed. Antigen retrieval was carried out in citrate buffer solution (0.291% sodium

citrate, 0.05% Tween 20, pH 6.0) using microwave for 3 × 5 min. Standard ABC (Avidin Biotin Complex) method was used for the detection with 3,3'-Diaminobenzidine. Mayer's hematoxylin was used for counterstaining. Images were obtained using Olympus BX51 equipped with a DP25 digital camera. Data were analyzed with the Image-Pro Plus 5.1 software within 20 samples from different organ areas (40 visual fields were evaluated per sample). Experiments were carried out in duplicates for each time point (two mice for each time point).

Detection of EBV DNA and RNA

EBV-encoded RNA (EBER) was detected by *in situ* hybridization on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections using EBER peptide nucleic acid (PNA) Probe/Fluorescein and PNA ISH Detection Kit (DakoCytomation). It was carried out at the Institute of Pathology of the First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, according to the standard operating protocol.

DNA was isolated according to the manufacturer's instructions from 200 μ l of cell culture supernatant using High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche Diagnostics GmbH, Germany). EBV DNA was measured with quantitative real-time PCR (Light Cycler EBV Quant Kit, Cepheid AB, Sweden) and run on a Light Cycler 2.0 instrument (Roche Diagnostics GmbH, Germany). The test was performed according to the original manufacturer's protocol.

Ex Vivo Isolation of MCL Cells

The murine organs were homogenized using 45 μ M cell strainers (Becton Dickinson). Bone marrow was flushed from murine femurs with 3 ml of sterile PBS into a sterile container and passed through the 45- μ M cell strainer. Human MCL cells were isolated from homogenized murine organs (BM, liver (L), spleen (S), lymph node-like tumors (T)) by magnetic cell sorting using an anti-human-CD45 microbeads (Miltenyi Biotec) at T4 time point. The purity of MCL population after sorting was >95% in all cases as verified using flow cytometry. MCL cells cultured in parallel *in vitro* served as controls (CTRL cells) and were processed in the same way (that is, they were sorted on magnetic columns using anti-CD45 microbeads) to eliminate any potential bias caused during the magnetic cell sorting. *Ex vivo* obtained CD45-sorted cells were either directly used for experiments (designated BM, S, L, or T) or they were recultured for 14 days *in vitro* (designated BM-EX, S-EX, L-EX, and T-EX), after which they were again CD45-sorted and used for experiments.

GEP

Mino and Jeko-1 cell lines were used for GEP studies. Total mRNA was isolated from *in vitro* cultured or *ex vivo*-sorted MCL cells in RNA lysis solution using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Quality of RNA was assessed using the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technology).

Extracted RNA was amplified using the Illumina RNA Amplification Kit (Ambion). Amplified RNA was hybridized to the IlluminaHumanRef-12 BeadChips (Mino) and IlluminaHumanRef-8 Bead Chips (Jeko-1). Differences in gene expressions between MCL cells obtained from different murine organs were investigated. Data analysis was performed in R-software¹⁷ using Bioconductor¹⁸ repository packages. Particularly, we used the bead array package for data extraction.¹⁹ We further analyzed Illumina expression data on the level of unsummarized beads. We performed quantile normalization and *t*-test to find significantly differently expressed mRNAs between two states of our interest. A multiple testing correction was performed using the Benjamini and Hochberg method (Benjamini and Hochberg, 1995). The filtered group of genes with fold change greater/lower than ± 1.2 , and adjusted *P*-values < 0.05 were annotated and arranged into biologically relevant categories using The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID, <http://david.abcc.ncifcrf.gov>).

Flow Cytometry Analysis

Flow cytometry was performed on BD FACS Canto II and evaluated using FCS express software (version 3). The following directly conjugated antibodies were used in this study: an anti-human allophycocyanin (APC)-conjugated anti-CD44 (MEM-85), a phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD45R (MEM-28) (Exbio, Czech Republic), a PE-conjugated anti-CD31 (PECAM-1; WM59), a peridinin-chlorophyll protein Cyanine 5.5 (PerCP-Cy5.5)-conjugated anti-CD45 (2D1), a fluorescein isothiocyanate-labeled anti-CD20 (2H7), an APC-labeled anti-CD184 (CXCR4)-APC (12G5), a PE-conjugated anti-CD197 (CCR7; G043H7), and PE-conjugated anti-podoplanin (NC-08; BioLegend).

Cell Proliferation Assays

MCL cells were plated at a cell density of 5000 cells per 0.3 ml and exposed to the following chemotherapy agents: cytarabine or cisplatin. Cell proliferation was measured using the WST-8-based Quick Cell Proliferation Assay Kit (BioVision) according to the manufacturer's instructions.

Re-Transplantation Experiments

MCL cells were obtained from the BM of NSG mice inoculated with 10×10^6 Mino or 1×10^6 Jeko-1 cells (primary recipients). MCL purification was achieved using CD45 microbeads. Subsequently, isolated MCL cells were inoculated via tail vein injection into additional non-radiated NSG mice (secondary recipients). NSG mice inoculated with *in vitro* growing MCL cells (CTRL cells) were used as controls.

Similar experiments were performed using cells isolated from MCL patients. For these experiments, primary MCL cells were isolated from infiltrated organs (spleen) of NSG mice (primary recipients). No cell sorting was used; instead, unsorted MCL cells were obtained *ex vivo* from the infiltrated spleen by passing the spleen through the 45- μ M cell strainer,

washed in PBS, and injected into sublethally irradiated NSG mice (secondary recipients).

Experimental Single-Agent Therapy of MCL Xenografts

To study the effects of therapeutic interventions in our *in vivo* models, NSG mice were inoculated with 10×10^6 Mino, 1×10^6 Jeko-1, or 10×10^6 NEMO cells and divided into several treatment cohorts (five to eight animals/cohort). Treatment started 5 days post inoculation and continued until T4. Control group received sterile PBS. Treatment groups received the following single-agent treatments: (1) cyclophosphamide (3 mg/dose) once weekly, (2) gemcitabine (10 mg/dose) once weekly, (3) fludarabine (1 mg/dose) for 3 consecutive days every week, (4) temsirolimus (1 mg/dose) once weekly, (5) bortezomib (25 μ g/dose) twice weekly, (6) rituximab (0.3 mg/dose) twice weekly, (7) bevacizumab (0.3 mg/dose) twice weekly, (8) lenalidomide (1 mg/dose) daily on working days until T4. All agents were administered intraperitoneally (i.p.). Differences in survival between treatments groups were evaluated using Kaplan–Meier survival estimates, which were set-up using Graph-Pad Prism software.

RESULTS

Mouse Models of Human MCL Using Primary MCL Cells

Primary MCL cells ($n=12$) were isolated from the peripheral blood (PB, $n=8$), PB and BM ($n=2$), involved lymph node ($n=1$) or pleural effusion (PE) ($n=1$) of MCL patients. Most of the patients presented with the classic variant MCL ($n=8$). In addition, MCL cells were isolated from pleo-

morphic ($n=1$) or blastoid variant ($n=3$) MCL. Cells were isolated from previously untreated patients ($n=10$) or at the time of relapse ($n=2$). Most patients had high MCL International Prognostic Index (MIPI) score ($n=11$) and had adverse cytogenetics defined as either deletion of TP53 or deletion of ATM ($n=9$). Engraftment of cyclin D1+ cells was observed in 7 out of 12 patient-derived cell suspensions injected into NSG mice (Table 1, Figure 1). Engraftment was observed across all three morphological variants, including classic ($n=4/8$), pleomorphic (1/1), or blastoid variant (2/3) MCL. With the exception of cells isolated from VFN-1 patient, all detectable engraftments of cyclin D1+ MCL cells were observed in the spleen of NSG mice. The extent of splenic infiltration by MCL cells (cyclin D1+ cells) and their proliferation rate (KI-67+ cells) were variable (Figure 1). Inoculation via tail vein injection of MCL cells isolated from case VFN-1 resulted in the diffuse infiltration by cyclin D1+ cells in the spleen, BM, liver, and kidneys (but not central nervous system (CNS)). Apart from VFN-1, xenotransplantation of two primary MCL samples (VFN-4 and VFN-10) resulted in significant infiltration of the spleen by cyclin D1+/KI-67+ MCL cells (Figure 1b) with no IHC signs of involvement of the liver or BM. Inoculation of NSG mice with primary tumor cells isolated from four patients (cases VFN-3, VFN-6, VFN-7, and VFN-8) was associated with splenic engraftment of CD45+ cells, composed of cyclin D1+, CD20+/cyclin D1-, and CD3+ cells (Figure 1c). Of interest, inoculation of NSG mice with primary tumor cells isolated from patients VFN-2, VFN-11, and VFN-12 resulted in the engraftment of cyclin D1/CD20+/EBER+

Table 1 Primary MCL cells

Patient	Age	Gender	Histological variant	Cytogenetic aberrations	MIPI	Disease status	Sample origin	Number of cells ($\times 10^6$) injected per mouse
VFN-1	64	F	Blastoid	Plus ATM	8.5	1	PB	40
VFN-2	68	M	Blastoid	del 13q34, del ATM, del P53, del CDKN2A, MYC breakage	8.5	0	PB	10
VFN-3	76	M	Blastoid	Monosomy 9 and 13, del ATM	8.5	0	PB+BM	20
VFN-4	70	F	Classic	del 13q34, del ATM, del P53, del CDKN2A	9.1	0	PB+BM	25
VFN-5	46	F	Classic	del 13q14, monosomy 9, del P53, del of CDKN2A	7.5	0	PB	20
VFN-6	58	M	Classic	del 13q14, del 13q34, del ATM, MYC gain	7.6	0	PB	15
VFN-7	56	M	Classic	Monosomy 13, del ATM, del P53, del CDKN2A	8.2	0	PB	40
VFN-8	64	F	Classic	NA	6.8	0	PB	30
VFN-9	79	F	Classic	Normal karyotype	7.6	0	PB	40
VFN-10	64	F	Pleomorphic	del ATM, del P53	8.5	0	PB	80
VFN-11	48	M	Classic	Monosomy 17, del ATM	5.4	0	LN	20
VFN-12	74	M	Classic	del 13q34, monosomy 3 and 9, del ATM, del P53, MYC gain	7.1	1	PE	50

Abbreviations: BM, bone marrow; Disease status (0—at diagnosis, 1—at relapse); F, female; LN, lymph node; M, male; MCL, mantle cell lymphoma; MIPI, Mantle cell lymphoma International Prognostic Index; PB, peripheral blood; PE, pleural effusion.

cells (Figure 1d). Quantitative real-time PCR of EBV DNA of the *ex vivo* cultured cells obtained from the infiltrated murine spleen of NSG mice inoculated with either VFN-2, VFN-11, or VFN-12 cells confirmed the presence of EBV DNA. No infiltration of the CNS was detected using IHC analysis in any of the NSG mice inoculated with primary tumor cells isolated from 12 MCL patients. Re-transplantation of the engrafted primary MCL cells was carried out only in the case of VFN-1 sample, namely owing to sufficient numbers of the MCL cells obtained *ex vivo* from the infiltrated murine spleen. However, as the engrafted cells were no longer *stricto sensu* primary MCL cells originally contained in the VFN-1 sample, but MCL cells engrafted in the murine tissues, we designated them as NEMO cells. We clearly demonstrated that NEMO cells readily re-engrafted into secondary recipients upon tail vein injection. OS of mice xenografted with 10×10^6 per mouse NEMO cells was significantly shorter compared with the survival of mice xenografted with 40×10^6 million per mouse VFN-1 cells (30.9 ± 5.9 vs 61.3 ± 6.8 , $P < 0.05$). IHC analysis of NEMO-xenografted mice confirmed the diffuse infiltration of the spleen, BM, liver, and kidneys with cyclin D1+ NEMO cells (Supplementary Figure 1).

Mouse Models of Human MCL Using Established MCL Cell Lines

Engraftment was achieved after xenotransplantation of all five MCL cell lines. The median OS of the xenografted mice was 22 ± 1 days for Granta-519, 30 ± 1.4 days for Hbl-2, 37.3 ± 5.1 days for Jeko-1, 53.5 ± 2 days for Mino, and 53.8 ± 3.4 days for Rec-1 cells. A shared IHC finding in all MCL-bearing animals was the gradually increasing lymphoma infiltration of the BM, spleen, and liver (Figure 2, Supplementary Figure 2, Table 2a) over time. Whereas involvement of the CNS was observed in animals injected with all five MCL cell lines, infiltration of the PB and kidneys was variable (Table 2b). Animals inoculated with Jeko-1 and Rec-1 cells often developed enlargement of the ovaries due to lymphoma infiltration (Figure 2b, Supplementary Figure 2b). Interestingly, mice engrafted with Mino cells frequently developed lymph node-like tumors in the axillary and submandibular regions, or 'extranodal' tumors (intra-abdominal, intra-orbital, or subcutaneous). In addition, mice with bulky intra-abdominal tumors often had malignant ascites (confirmed by FACS, data not shown). IHC analysis of the enlarged submandibular tumor by Gömöri impregnation revealed collagen 3-rich lymph node-like structure composed predominantly of human MCL B cells (Figure 2a). Mice injected with Hbl-2 cells typically developed hind-leg paralysis at T4 (Figure 2c). Signs of terminal disease (weight loss and generalized inability to thrive) were observed in mice injected with Granta-519, Jeko-1, Mino, and Rec-1 cell lines by T4. The extent of infiltration of murine tissues with all five MCL cell lines during T1–T4 time points are given in Table 2. Weights of the murine spleen and liver at T4 correlated with the extent of organ infiltration and are given in Table 2b.

GEP Changes of Ex Vivo Obtained MCL Cells when Compared with In Vitro Growing Cell Line Controls

GEP of MCL cells obtained *ex vivo* from different murine organs (BM, S, L, and T) clustered together and displayed complex GEP changes compared with *in vitro* growing controls (CTRL; Figure 3a). Interestingly, GEP signature of *ex vivo* MCL cells isolated from NSG mice cultured for 14 days *in vitro* reverted to the original MCL *in vitro* signature (Figure 3a). In addition, the filtered group of genes with fold change greater than 1.2 and adjusted P -value < 0.05 were annotated and arranged into biologically relevant categories using the DAVID database. B-cell receptor signaling (19 genes) and JAK-STAT signaling (29) pathways belonged to the most upregulated gene sets (out of 16, $P < 0.05$) in BM compared with CTRL Mino cells. B-cell receptor signaling (26 genes), chemokine signaling (40), leukocyte transendothelial migration (28), mammalian target of rapamycin signaling (14), and cell cycle (24) were among the most upregulated signaling pathways/gene signature sets (out of 30, $P < 0.05$) in BM compared with CTRL Jeko-1 cells. The oxidative phosphorylation gene set was the most downregulated group of genes (out of 15) in Jeko-1 BM cells (46 genes, $P < 0.05$), and the second most downregulated one (out of 20) in Mino BM cells (55 genes, $P < 0.05$) compared with CTRL cells.

Immunophenotype Changes Following In Vivo Engraftment of MCL Cells

Flow cytometry analysis of Mino cells isolated from a lymph node-like tumor (T) in NSG mice compared with CTRL. Mino cells demonstrated the upregulation of CD44 and a downregulation of CCR7 and podoplanin. In addition, flow cytometry analysis of Mino cells obtained from the infiltrated BM in NSG mice compared with CTRL Mino cells demonstrated cell surface downregulation of CCR7, CXCR4, CD44, and podoplanin (Figure 3b). The degree of CCR7 downregulation in the BM compartment was more profound than that in the lymph node compartment (Figure 3b). Flow cytometry analysis of the Jeko-1 cells obtained from NSG mice (BM and spleen) compared with CTRL Jeko-1 cells grown *in vitro* demonstrated an upregulation of CD31 and CD44 and a downregulation of CCR7, CXCR4, and podoplanin (Figure 3b). *Ex vivo* obtained MCL cells recultured for 2 weeks *in vitro* (BM-EX, T-EX, and S-EX) had immunophenotype profiles similar to CTRL cells (data not shown).

Sensitivity to Cytotoxic Agents of MCL Subpopulations Obtained Ex vivo from Different Murine Organs Compared with In Vitro Growing Controls

MCL cells (Mino CTRL, Mino BM, Mino T, Jeko-1 CTRL, Jeko-1 BM, Jeko-1 S, and Jeko-1 L) were incubated with increasing doses of selected cytotoxic agents (cisplatin and cytarabine). Mino BM cells were more sensitive to cisplatin and cytarabine (approximately twofold) than CTRL Mino

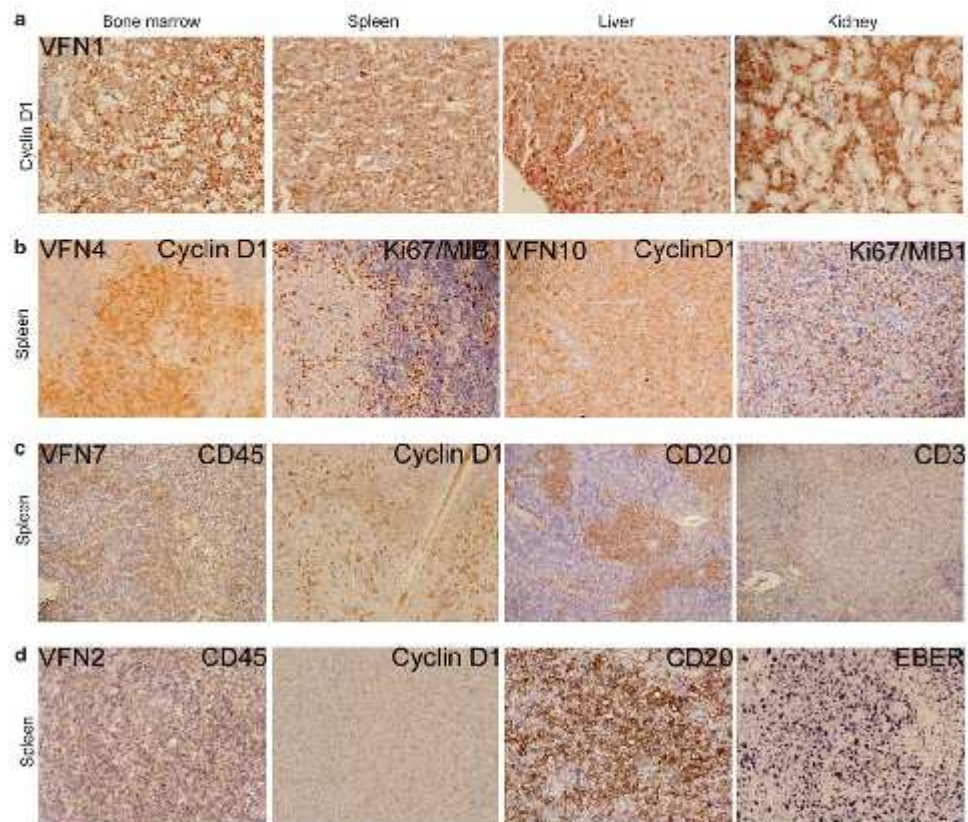


Figure 1 Engraftment of primary mantle cell lymphoma (MCL) cells in NOD-SID-gamma (NSG) mice. (a) Immunohistochemical (IHC) analysis of murine tissues showing diffuse infiltration with cyclin D1+ primary MCL cells obtained from peripheral blood of the patient (VFN-1) with relapsed/refractory disease in transformation to blastoid variant MCL. (b) IHC analysis (cyclin D1 and Ki67) of murine spleen showing engagement of primary MCL cells (VFN-4 and VFN-10) in NSG mice. (c) Xenotransplantation of VFN-7 primary MCL cells resulted in splenic engraftment of CD45+ cells, composed of cyclin D1+ cells, CD20+/cyclin D1-negative cells, and CD3+ cells. (d) Xenotransplantation of VFN-2 primary MCL cells resulted in splenic engraftment of CD45+/cyclin D1-/CD20+/EBER+ cells. Original magnification: $\times 200$.

cells (Supplementary Figure 3). There were no differences in the sensitivity to cisplatin or cytarabine between T and CTRL Mino cells (data not shown). Jeko-1 BM cells were more sensitive to cisplatin (approximately twofold) and cytarabine (approximately fourfold) than CTRL Jeko-1 cells (Supplementary Figure 3). Jeko-1 S cells were more sensitive to cisplatin (approximately twofold), but not to cytarabine, compared with CTRL Jeko-1 cells (data not shown). There were no differences in the sensitivity to cisplatin or cytarabine between L and CTRL Jeko-1 cells (data not shown).

Secondary Recipients Xenografted with MCL Cells Obtained *Ex Vivo* from the Bone Marrow of Primary Recipients have Significantly Shorter OS Compared with Mice Xenografted with CTRL Cells

On the basis of the results obtained from the microarray and flow cytometry experiments, we assumed that MCL cells growing *in vivo* display complex changes of GEP and immunophenotype, and that those changes may reflect the MCL cell adaptation to the murine microenvironment. We thus decided to test the ability of the *ex vivo* obtained MCL cells to re-engraft into secondary recipients and to evaluate

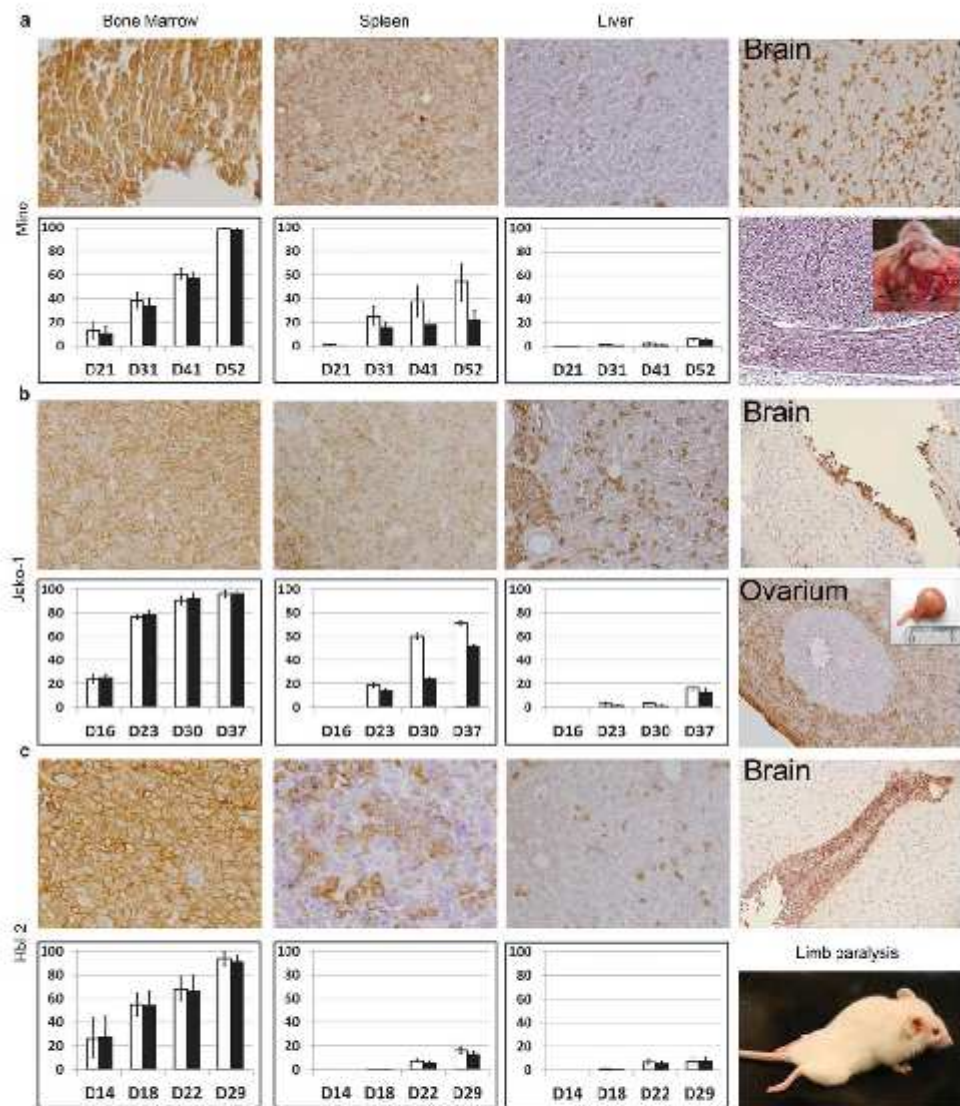


Figure 2 Engagement of Mino (a), Jeko-1 (b), and Hbl-2 (c) cells in NOD-SCID-gamma (NSG) mice. Immunohistochemical (IHC) analysis of murine bone marrow (BM), spleen, liver, and brain with anti-human CD20 Ab at T4 time point, and the percent infiltration of murine BM, spleen, liver with mantle cell lymphoma (MCL) cells at T1–T4 time points for each cell line (a–c) are shown (IHC analysis with anti-human CD20 (white columns) and Ki-67 (black columns)). Cell line-specific features of engagement are also shown: (a) A lymph node-like tumor in the left submandibular region of a Mino-xenografted mouse at T4 time point. Gömori impregnation revealed collagen 3-rich lymph node-like structures composed predominantly of human MCL B cells. (b) An enlarged ovary of Jeko-1-xenografted mouse at T4. IHC analysis (anti-human CD20) showing human MCL cells embedded in the stromal tissue with no signs of invasion into the ovarian follicles. (c) Typical pretarantal hind-leg paralysis of a Hbl-2-xenografted mouse at T4. Original magnification $\times 200$.

Table 2 Engraftment of MCL cell lines in NSG mice

	T1	T2	T3	T4
<i>(a) Percent infiltration of murine tissues with MCL cells (BM, spleen, and liver) at T1–T4 time points</i>				
<i>Mino</i>				
BM	12.7 ± 7	38.6 ± 6.6	61.0 ± 4.8	99.1 ± 0.2
Spleen	1.4 ± 0.2	24.9 ± 8	38.0 ± 12.6	54.2 ± 15.2
Liver	0.6 ± 0.1	1.6 ± 0.1	2.4 ± 0.6	6.3 ± 0.9
<i>Jeko-1</i>				
BM	24.1 ± 3.6	76.3 ± 1.6	90.8 ± 3.3	96.0 ± 2.5
Spleen	0	18.7 ± 2.1	60.2 ± 2.7	71.5 ± 2.1
Liver	0	3.8 ± 1	3.9 ± 0.6	16.7 ± 2.8
<i>Hbl-2</i>				
BM	26.9 ± 16.9	55.0 ± 9.0	68.6 ± 10.1	94.1 ± 5.2
Spleen	0	0.2 ± 0.1	7.7 ± 1.7	16.5 ± 2.7
Liver	0	1.0 ± 0.5	7.2 ± 2.7	7.6 ± 3.0
<i>Granta-519</i>				
BM	4.3 ± 3.9	18.7 ± 9.0	33.9 ± 8.1	62.1 ± 16.2
Spleen	0.1 ± 0	0.8 ± 0.3	18.7 ± 9.7	41.3 ± 11.7
Liver	0.9 ± 0.4	12.3 ± 4.1	38.9 ± 11.5	51.7 ± 12.9
<i>Rec-1</i>				
BM	34.9 ± 2.9	45.2 ± 3.2	57.0 ± 2.9	59.0 ± 6.3
Spleen	12.8 ± 2.0	20.5 ± 2.6	46.7 ± 4.1	47.7 ± 3.9
Liver	0	9.8 ± 0.9	28.4 ± 3.0	40.1 ± 5.4

(b) Percent infiltration of murine kidneys and peripheral blood with MCL cells at T4. Weights of the murine spleen and liver of control mice (Ctrl) and MCL-xenografted mice at T4

	Kidney	PB	Spleen (m/mg)	Liver (m/mg)
Mino	26.9 ± 6.8	0	332 ± 55	1296 ± 249
Jeko-1	5.2 ± 3.5	2.2 ± 0.9	406 ± 36	1711 ± 268
Hbl-2	2 ± 1.5	1.2 ± 1	27 ± 2	733 ± 131
Granta-519	10.5 ± 6.9	12.7 ± 0.1	66 ± 8	3646 ± 75
Rec-1	0.5 ± 0.1	0	178 ± 92	2443 ± 706
Ctrl mice (n = 3)			38 ± 17	891 ± 38

Abbreviations: BM, bone marrow; MCL, mantle cell lymphoma; NSG, NOD-SID-gamma; PB, peripheral blood.

changes in disease behavior. Of interest, the OS of secondary recipient NSG mice xenografted with 0.5×10^6 Mino BM cells was shorter than secondary recipients inoculated with Mino CTRL cells (65.2 ± 3.6 vs 84 ± 8 and days, respectively ($P < 0.001$)) (Supplementary Figure 4). Similarly, the OS of secondary recipients inoculated with 0.8×10^6 Jeko-1 CTRL

was 41.2 ± 2.6 vs 33.8 ± 2.8 for secondary recipients of Jeko-1 BM cells ($P < 0.001$; Supplementary Figure 4).

Experimental Therapy of MCL-Xenografted Mice

The established *in vivo* models of MCL, both cell line-based (Mino- and Jeko-1-xenografted mice) and primary cell-based

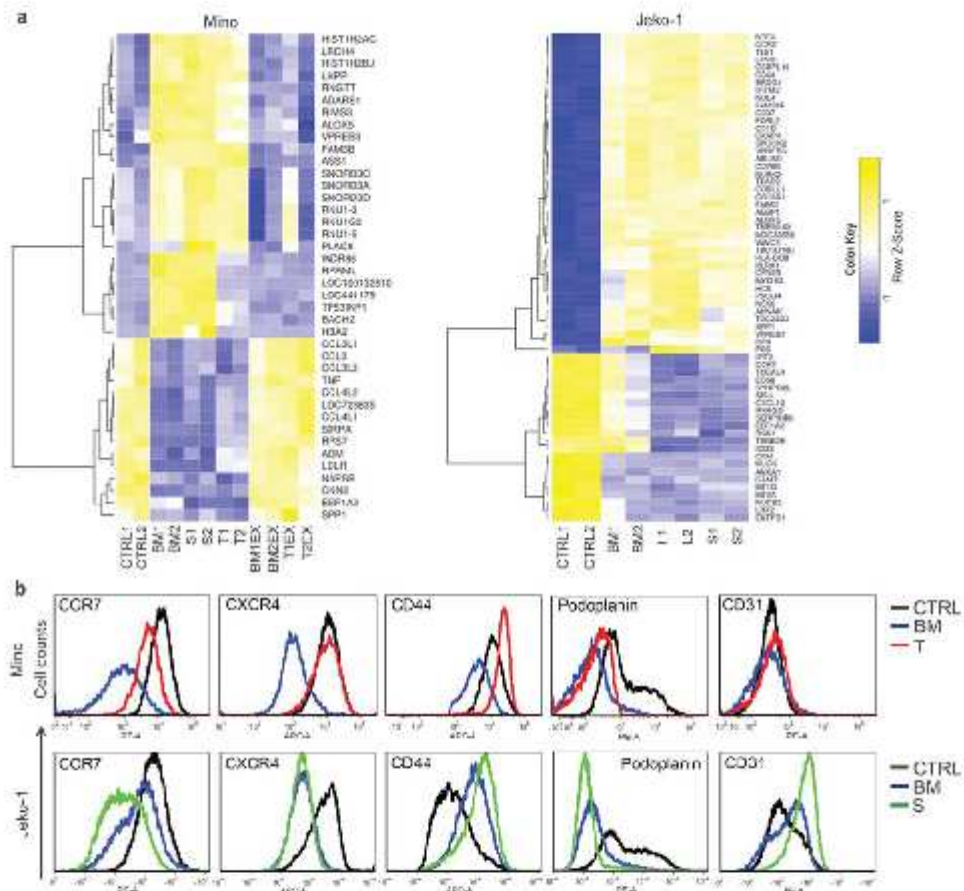


Figure 3 Phenotypic differences between mantle cell lymphoma (MCL) cells obtained *ex vivo* from murine tissues compared with *in vitro* growing controls. (a) The most differently expressed genes of MCL cells obtained *ex vivo* from different murine organs: bone marrow (BM), spleen (S), liver (L), and lymph node-like tumors (T) of Mino- and Jeko-1-bearing mice compared with *in vitro* growing controls (CTRL). Gene expression signature of *ex vivo* obtained Mino cells (left) cultured for 14 days *in vitro* reverts to the original *in vitro* signature. (b) Flow cytometry analysis of MCL cells obtained *ex vivo* from different murine organs (BM, S, and T) compared with CTRL cells.

(NEMO-bearing mice) were used as tools for the preclinical assessment of experimental therapeutic approaches. Apart from the standardly used chemotherapy drugs (fludarabine, gencitabine, and bortezomib), the mice were treated with agents, the antitumor activity of which cannot be reliably evaluated *in vitro* including monoclonal antibodies (rituximab and bevacizumab), pro-drugs (cyclophosphamide), cell signaling inhibitors (temsirolimus), or immunomodulatory agents (lenalidomide). *In vivo* treatment of MCL inoculated NSG mice with gencitabine (Gem), temsirolimus (Tem),

cyclophosphamide (Cyc), and rituximab (Rit) significantly prolonged OS in all three tested xenograft models ($P < 0.05$). Fludarabine (Flu) significantly prolonged OS in Jeko-1 and Mino ($P < 0.05$), but not in NEMO-xenografted mice. Bevacizumab (Bev) significantly ($P < 0.05$) prolonged OS in Jeko-1 and NEMO, but not in Mino-xenografted mice. Lenalidomide (Len) significantly prolonged OS only in NEMO-bearing mice, whereas bortezomib (Bor) failed to prolong OS in any of the three tested mouse models at the dose/schedule tested (Figure 4).

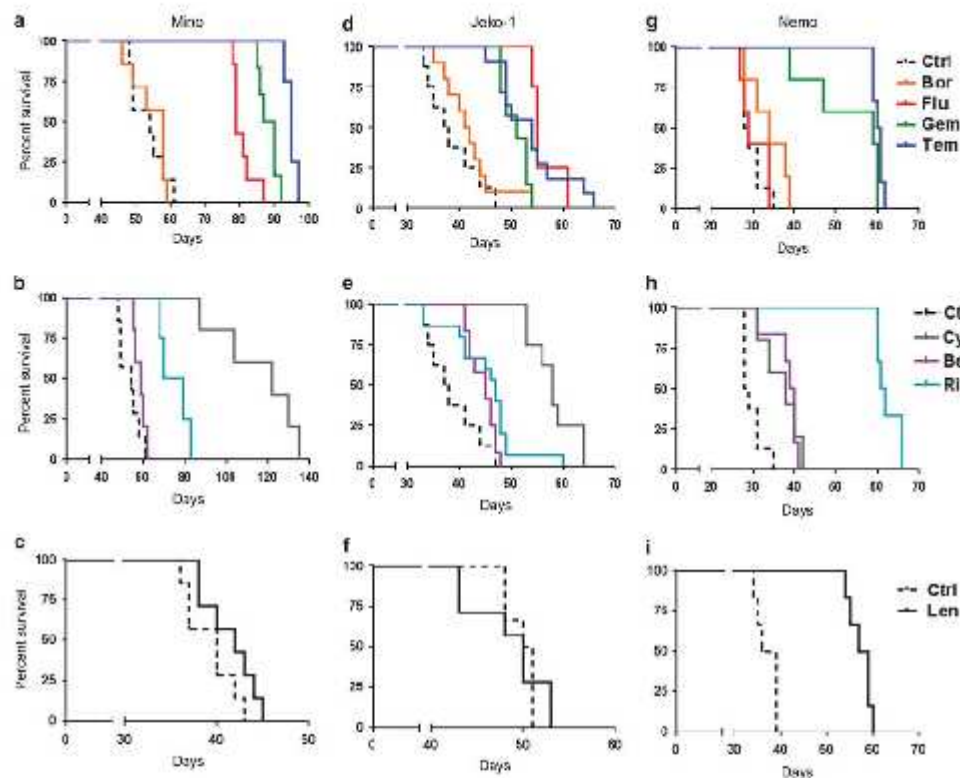


Figure 4 Experimental therapy of xenografted mice. Kaplan-Meier survival curves showing overall survival (OS) of individual treatment cohorts (five to eight animals per cohort) of Mino (a-c), Jeko-1 (d-f), and Nemo (g-i) xenografted mice compared with untreated controls (Ctrl). Gemcitabine (Gem), Temsirolimus (Tem), Cyclophosphamide (Cyc), and Rituximab (Rit) significantly prolonged OS in all Mino (a, b), Jeko-1 (d, e), and Nemo (g, h) xenografted mice ($P < 0.05$). Bevacizumab (Bev) significantly ($P < 0.05$) prolonged OS in Jeko-1 (e) and Nemo (h), but not in Mino (b), xenografted mice. Fludarabine (Flu) significantly ($P < 0.05$) prolonged OS in Mino (a) and Jeko-1 (d), but not in Nemo (g) xenografted mice. Bortezomib (Bor) failed to prolong OS in all MCL-bearing mice (a, d, g). Lenalidomide (Len) significantly ($P < 0.05$) prolonged OS in Nemo-xenografted mice (i) and failed to prolong OS in both Mino- (c) and Jeko-1 (f)-xenografted mice. Pooled data of two independent experiments are shown.

DISCUSSION

We established and characterized several metastatic mouse models of human MCL using both primary cells and established cell lines. We first demonstrated that primary MCL cells could engraft in the irradiated NSG mice (Figures 1a and b). Apart from the engraftment of predominantly cyclin D1+ cells (VFN-1, VFN-4, and VFN-10), more complex patterns were observed, including engraftments composed of cyclin D1+, CD20+, and CD3+ cells (VFN-3, VFN-6, VFN-7, and VFN-8). Importantly, in as many as three cases (VFN-2, VFN-11, and VFN-12) injection of primary MCL cells resulted in the engraftment of EBV+ B-cell clones. In general, mouse models of human MCL using primary cells are feasible; however, they

are associated with unreliable engraftment and require IHC to confirm engraftment of cyclin D1+ cells, and exclude engraftment of EBV+ B-cell clones or non-MCL cells (for example, T cells). We also demonstrated that in occasional cases (VFN-1) the engrafted primary MCL cells can be harvested (ideally from the enlarged spleen) and either frozen or directly used for re-transplantation into secondary recipients.

Despite the fact that selected primary MCL cells do engraft in immunodeficient NSG mice, it must be taken in mind that most of the currently published preclinical therapies are carried out using established MCL cell line xenografts, usually after subcutaneous injection, whereas i.v. xenotransplantations are less frequently used. In addition, little is

known about the way of engraftment and/or spread of the lymphoma cells in the murine organism upon xenotransplantation, or about their potential phenotype changes induced by murine microenvironment.

In this study we thoroughly characterized engraftments of five widely used MCL cell lines (Mino, Jeko-1, Granta-519, Hbl-2, and Rec-1) in the immunodeficient NSG mice. In contrast to primary MCL cells, the engraftment of which occurred almost exclusively in the spleen, the principal site of engraftment of all MCL cell lines appeared to be the BM, from where MCL cells apparently disseminated to the spleen, liver, and later in the course of disease to other murine organs and tissues, including the CNS and kidneys. Involvement of other organs, including ovaries, lymph nodes, or PB, appeared to be MCL cell line-specific. The median OS of mice xenografted with MCL cells ranged from 22 ± 1 to 54 ± 3 days. By far, the most biologically aggressive MCL cell line was Granta-519, despite the fact that it demonstrated the slowest proliferation rate *in vitro* of all five MCL cell lines (data not shown). The reason for the observed diversity in the biological aggressiveness of the five MCL cell lines remained largely elusive.

Interestingly, GEP and flow cytometry experiments unveiled that MCL cells growing *in vivo* in different murine organs had different gene expression signatures and immunophenotypes (*in vivo* signature) compared with *in vitro* growing MCL cells (*in vitro* signature). Genes coding for chemokines and chemokine receptors, including CXCL10, CCL3, CCL3L3, CCL4L1, CCL4L2, CXCR4, or CCR7, belonged to the most deregulated genes in MCL cells *in vivo* compared with cells *in vitro*. These results highlight the influence of the tumor microenvironment to the biology of MCL. 'Oxidative phosphorylation' and 'B-cell receptor signaling' belonged to the most downregulated and upregulated functional clusters, respectively. We assume that upon engraftment, MCL cells undergo complex changes of gene and protein expression as a result of adaptation to the microenvironment of murine tissues, including cell-cell interactions, hypoxia, lack of nutrients, engagement of integrin receptors and so on. Not surprisingly, mice re-transplanted from primary to secondary mouse recipients had significantly shorter OS compared with mice xenografted with CTRL cells.

Finally, we confirmed that the mouse models could be used for preclinical assessment of current or novel therapies. Curiously, we noticed a marked difference between the tested *in vitro* sensitivity of MCL cells to some anticancer agents and rather poor outcome when using the same agent for the *in vivo* therapy of MCL-xenografted mice. For example, the *in vitro* lethal dose (LD100) of Jeko-1 cells to gemcitabine and bortezomib was 10 and 16 nM, respectively. Despite the excellent *in vitro* sensitivity to both agents, bortezomib therapy of Jeko-1-xenografted mice failed to improve OS, whereas therapy with high doses of gemcitabine did not lead to eradication of the lymphoma. We suppose that the

observed discrepancy between *in vitro* sensitivity (excellent) and *in vivo* efficacy (poor) of many of the tested cytotoxic agents could be explained by the phenotypic changes associated with the engraftment and described in detail above. We also observed that immunomodulatory agent lenalidomide, the anticancer activity of which is based on the modulation of complex interactions of lymphoma cells with the microenvironment, failed to prolong survival of MCL cell line-xenografted mice (Mino and Jeko-1), but significantly prolonged survival of NEMO-bearing mice. In sharp contrast to Jeko-1 and Mino cells, NEMO cells (derived from VFN-1 patient sample) underwent rapid apoptosis upon *ex vivo* culture (after isolation from the infiltrated murine spleen), which clearly emphasizes the continuous dependence of NEMO cells on murine microenvironment for survival (data not shown). We suppose that targeted disruption of these pro-survival bonds by lenalidomide might be responsible for the observed prolongation of OS of NEMO-bearing mice. NEMO-xenografted mice thus represent an appropriate *in vivo* system for the study of lenalidomide biology.

In conclusion, we established and characterized several mouse models of human MCL using both primary MCL cells and MCL cell lines. We demonstrated that the engrafted MCL cells are biologically distinct populations because they display complex changes in gene expression, immunophenotype, and sensitivity to cytotoxic agents compared with *in vitro* growing MCL cell lines. These findings may have extensive implications for preclinical research.

Supplementary information accompanies the paper on the Laboratory Investigation website (<http://www.laboratoryinvestigation.org>)

ACKNOWLEDGMENTS

We to Gabriela Spanila and Miluse Krejčiková for quantitative analysis of EBV DNA. All *in vivo* experiments were performed at the Centre for Experimental Biomodels, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague. This study was supported by GA-MZ NT13201-4/2012, UNCE 204021, PRV0JK P24/LF1/3, PRV0JK 27/LF1/1, GAČR P302/12/G157/1, GAUK 446211.

DISCLOSURE/CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

1. Bosch F, James P, Campo E, et al. PRAD-1/cyclin D1 gene overexpression in chronic lymphoproliferative disorders: a highly specific marker of mantle cell lymphoma. *Blood* 1994;84:2726-2732.
2. Pinyol M, Hernandez L, Cazorla M, et al. Deletions and loss of expression of p16INK4a and p21Waf1 genes are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas. *Blood* 1997;89:272-280.
3. Hernandez L, Bea S, Pinyol M, et al. CDK4 and MDM2 gene alterations mainly occur in highly proliferative and aggressive mantle cell lymphomas with wild-type INK4a/ARF locus. *Cancer Res* 2005;65:2199-2206.
4. Camacho E, Hernandez L, Hernandez S, et al. ATM gene inactivation in mantle cell lymphoma mainly occurs by truncating mutations and missense mutations involving the phosphatidylinositol-3 kinase domain and is associated with increasing numbers of chromosomal imbalances. *Blood* 2002;99:238-244.

- Greiner TC, Moynihan MJ, Chan WC, et al. p53 mutations in mantle cell lymphoma are associated with variant cytology and predict a poor prognosis. *Blood* 1996;87:4302-4310.
- Lenz G, Dreyling M, Hiddemann W. Mantle cell lymphoma: established therapeutic options and future directions. *Ann Hematol* 2004;83:71-77.
- Weisenburger DD, Vose JM, Greiner TC, et al. Mantle cell lymphoma. A clinicopathologic study of 68 cases from the Nebraska Lymphoma Study Group. *Am J Hematol* 2000;64:190-196.
- Foad RJ, Shen L, Lin-Lee YC, et al. Development of a murine model for blastoid variant mantle-cell lymphoma. *Blood* 2007;109:4899-4906.
- Vincent-Fabert C, Fiancette R, Rouaud P, et al. A defect of the INK4-Cdk4 checkpoint and Myc collaborate in blastoid mantle cell lymphoma-like lymphoma formation in mice. *Am J Pathol* 2012;180:1688-1701.
- Smith MR, Joshi L, Jin F, et al. Murine model for mantle cell lymphoma. *Leukemia* 2006;20:891-893.
- Wang M, Zhang L, Han X, et al. A severe combined immunodeficient-hu in vivo mouse model of human primary mantle cell lymphoma. *Clin Cancer Res* 2008;14:2154-2160.
- Rolland D, Camara-Chayette V, Barbarat A, et al. Farnesyltransferase inhibitor R115777 inhibits cell growth and induces apoptosis in mantle cell lymphoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008;61:855-863.
- Gupta M, Hendrickson AE, Yun SS, et al. Dual mTORC1/mTORC2 inhibition diminishes Akt activation and induces Puma-dependent apoptosis in lymphoid malignancies. *Blood* 2012;119:476-487.
- Jones RJ, Baladandayuthapani V, Neelapu S, et al. HDM-2 inhibition suppresses expression of ribonucleotide reductase subunit M2, and synergistically enhances gemcitabine-induced cytotoxicity in mantle cell lymphoma. *Blood* 2011;118:4140-4149.
- Mahadevan D, Stejskal A, Coole LS, et al. Aurores A inhibitor (MLN8237) plus vincristine plus rituximab is synthetic lethal and a potential curative therapy in aggressive B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Clin Cancer Res* 2012;18:2210-2219.
- Gomoll G. Silver impregnation of articulum in paraffin sections. *Am J Pathol* 1937;13:993-1002 S.
- Team RDC. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing 2011 (ISBN 3-900051-07-0).
- Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor. 2005; Accessed at <http://www.springerlink.com/content/g26110k024423738/>.
- Dunning MJ, Smith ML, Ritchie ME, et al. beadarray: R classes and methods for illumina bead-based data. *Bioinformatics* 2007;23:2183-2184.

Single-agent cytarabine is insufficient for the treatment of human mantle cell lymphoma in mouse xenograft model

M. KLANOVA^{1,2*}, T. SOUKUP³, J. MOLINSKY^{1,2}, L. LATECKOVA^{1,2}, P. VOCKOVA^{1,2}, M. ALAM¹, J. ZIVNY¹, M. TRNENY¹, P. KLENER^{1,2}

¹Institute of Pathological Physiology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, U Nemocnice 5, Prague, Czech Republic; ²First Department of Medicine- Clinical Department of Haematology, General University Hospital and First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, U Nemocnice 2, Prague, Czech Republic; ³Institute of Histology and Embryology, Medical Faculty Hradec Kralove, Charles University, Simkova 870, Hradec Kralove, Czech republic

*Correspondence: magda.klanova@f1.cuni.cz

Received October 13, 2015 / Accepted May 9, 2016

Mantle cell lymphoma is an aggressive type of B-cell non-Hodgkin lymphoma with adverse prognosis. It was demonstrated that alteration of CHOP and DHAP chemotherapy improved outcome of mantle cell lymphoma patients. However, which components of DHAP, cisplatin, cytarabine, or both, were responsible for the improved outcome remained unclear. To answer this question, antitumor efficacies of equally toxic doses of cytarabine, cisplatin, and three different combinations were compared *in vivo* using mouse xenograft models of mantle cell lymphoma. We demonstrated that cisplatin, alone or with cytarabine, is significantly superior to single-agent cytarabine in both eliminating lymphoma cells and suppressing their proliferation rate.

Key words: mantle cell lymphoma (MCL), cisplatin, high-dose cytarabine, DHAP

Mantle cell lymphoma (MCL) is an aggressive type of B-cell non-Hodgkin lymphoma characterized by frequent relapses and adverse prognosis. Therapy of MCL has been for decades based on anthracyclines and alkylating agents, namely on the CHOP (cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone) or CHOP-like regimens. In recent years the outcome of patients with MCL has been improved by dose-intensification of anthracyclines, addition of high-dose araC (HDAC) to the multi-agent chemotherapy [1], incorporation of anti-CD20 antibody rituximab (R) into induction and maintenance [2-3], and consolidation with high-dose therapy and autologous stem cell transplantation (ASCT) [4]. Recently, several studies showed that DHAP regimen (dexamethasone, high-dose araC and cisplatin) is highly effective

as the frontline therapy of MCL patients [5-7]. Lefrere et al demonstrated that 4 cycles of DHAP were capable to convert insufficient responses (partial remissions or stable diseases) induced by 4 cycles of CHOP to complete remissions (CR) in as high as 84% of patients (22 of 26 patients) [5]. Recently, the randomized trial of The European Mantle Cell Network demonstrated that alternation of R-CHOP and R-DHAP increased significantly CR rates and time to treatment failure (TTF) compared to R-CHOP only [6]. Based on these results implementation of HDAC into induction regimen became the standard of care for all newly diagnosed younger MCL patients. The enthusiasm for HDAC in front-line therapy of MCL led even to attempts to avoid other chemotherapy agent in the front-line setting. However, the latest Nordic Lymphoma Group Mantle Cell Lymphoma 5 trial that evaluated "single"-agent HDAC (in combination with rituximab, but not other genotoxic agent standardly used in front-line therapy of MCL) was prematurely terminated because of insufficient efficacy [8]. Results from these clinical trials raised a crucial question, which of the two agents, Pt or araC (or both), actually contributed to the improved outcome of MCL patients. Despite that most clinicians (in our opinion)

Abbreviations: Mantle cell lymphoma (MCL), cisplatin (Pt), cytarabine (araC), high-dose araC (HDAC), CHOP (cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone), methotrexate (MTX), immunohistochemical (IHC), bone marrow (BM), twice daily (BID), overall survival (OS), DHAP (dexamethasone, high-dose araC and cisplatin), complete remission (CR), time to treatment failure (TTF), autologous stem cell transplantation (ASCT), rituximab (R), NOD-SCID-gamma (NSG), HyperCVAD (cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin and prednisone).

originally favored cytarabine (araC) over cisplatin (Pt), the recent Nordic Lymphoma Group trial 5 questioned this assumption. The main goal of this study was to identify, which of the two cytostatic components of the DHAP regimen, araC or Pt (or both), represents a key contributor of the improved clinical efficacy observed in newly diagnosed MCL patients treated with alternation of R-CHOP and R-DHAP compared to R-CHOP-only [6].

Materials and methods

MCL cell lines and culture conditions. Jeko-1 was obtained from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Hbl-2 was a kind gift of Prof. Martin Dreyling (University of Munch, Germany). Cell lines were cultured in Iscove's modified Dulbecco's medium supplemented with 15% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin at 37°C in 5% CO₂.

Immunodeficient mice. The NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1wjl}/SzJ mice (referred to as NOD-SCID-gamma (NSG)) were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA). All animals were housed and maintained in a pathogen free environment in individually ventilated cages and provided with sterilized food and water. The experiment design was approved by the institutional animal care and use committee.

Experimental therapy of MCL xenografts. Jeko-1 and Hbl-2 cell line-based mouse models of MCL were established in the same way as previously described [9]. Briefly, 8 – 16 week old female NSG mice were inoculated with 1 x 10⁶ Jeko-1 or Hbl-2 cells, and divided into 6 treatment cohorts (8-10 animals/cohort). Treatment was initiated in the middle of the estimated overall survival (OS) of untreated controls (which was day 18 and day 16 for Jeko-1 and Hbl-2-xenografted mice, respectively). The treatment was derived from the DHAP regimen. Pt and araC were administered on two consecutive days. Both agents were administered intraperitoneally (i.p.) as follows: 1. control group treated with PBS only; 2. single-agent cisplatin 240 µg; 3. single-agent cytarabine 10mg twice daily (BID) 12 hours apart; 4. three different combinations of both drugs designated as C1 (Pt 160 mcg + araC 2 mg BID), C2 (Pt 80 mcg + araC 3.5 mg BID), C3 (Pt 40 mcg + araC 5 mg BID). All treatment approaches were pre-tested to be equally toxic causing 10-20% early toxic deaths within 7 days of the drug

administration. When untreated controls developed signs of terminal disease, two mice from each cohort were subject to immunohistochemical (IHC) analysis of the selected murine organs. Remaining animals were euthanized by cervical dislocation when developed hind-leg paralysis or generalized inability to thrive. Differences in OS among treatment cohorts were calculated using Kaplan-Meier survival estimates set-up with the Graph-Pad Prism software.

Immunohistochemistry. Murine organs were removed, fixed in 4% formalin for 3 days, cut into tissue blocks, embedded in paraffin, and sectioned into transversal and longitudinal 6-7µm thick slices. Sections were stained with hematoxylin and eosin and Masson's blue trichrome. IHC staining for human CD20(L26) and Ki67/MIB1 (DakoCytomation) was performed. Antigen retrieval was done in citrate buffer solution (0.291% sodium citrate, 0.05% Tween 20, pH 6.0) using microwave for 3x5 minutes. Standard ABC (Avidin Biotin Complex) method was used for the detection with DAB (3,3'-Diaminobenzidine). Mayer's hematoxylin was used for counterstaining. Images were obtained using Olympus BX51 equipped with a DP25 digital camera. Data was analyzed by Image-Pro Plus 5.1 software within 20 samples from different organ areas (40 visual fields were observed). Experiments were carried out in duplicates (two mice for IHC analysis). The mean percent infiltration of murine tissues (bone marrow (BM) or spleen) with MCL cells (i.e. the percent of the area, which is occupied by CD20-positive or Ki67-positive cells) was calculated by the Image-Pro Plus 5.1 software and is shown (Figure 1B, Table 1).

Results

Mouse xenograft models of human aggressive MCLs were used to compare head-to-head anti-lymphoma efficacies of equally toxic doses of single-agent araC compared to single-agent Pt, and three different combinations of araC and Pt (C1-C3) [9]. Lymphoma-specific survival (defined as the time from lymphoma inoculation to lymphoma-caused demise of experimental animals) was significantly (p<0.05) prolonged in cohorts treated with single-agent Pt, and C1 combination compared to the other cohorts (Figure 1A, B). In addition, IHC analysis of the bone marrow (and the spleen in case of Jeko-1-bearing mice) demonstrated that mice from these treatment

Table 1. Results of immunohistochemical analysis showing percent infiltration (CD20) of murine bone marrow (BM) and spleen with MCL cells, and proliferation rate (Ki67) of MCL cells.

			Ctrl	Pt	araC	C1	C2	C3	
Jeko-1	BM	CD20	86.7 ± 2.8	10.3 ± 1.8	44.5 ± 3.2	0.5 ± 0.4	30.9 ± 1.6	45.7 ± 7.8	
		Ki67	84.9 ± 3.2	1.4 ± 0.2	2.5 ± 2.1	1.6 ± 1.6	3.1 ± 1.9	6.8 ± 5.1	
	% Infiltration (CD20) and proliferation (Ki67)	Spleen	CD20	53.3 ± 1.9	4.7 ± 1.4	25.6 ± 0.6	1.7 ± 1.2	20.0 ± 8.3	27.0 ± 1.6
		Ki67	21.6 ± 2.1	1.6 ± 0.7	13.5 ± 1.2	1.5 ± 0.4	6.7 ± 4.6	16.0 ± 3.1	
Hbl-2	BM	CD20	95.2 ± 4.8	19.2 ± 7.7	29.9 ± 5.4	21.8 ± 5.2	37.6 ± 6.1	41.0 ± 8.5	
		Ki67	89.1 ± 5.0	0.5 ± 0.0	14.2 ± 6.4	3.7 ± 1.6	21.5 ± 4.1	28.5 ± 5.3	

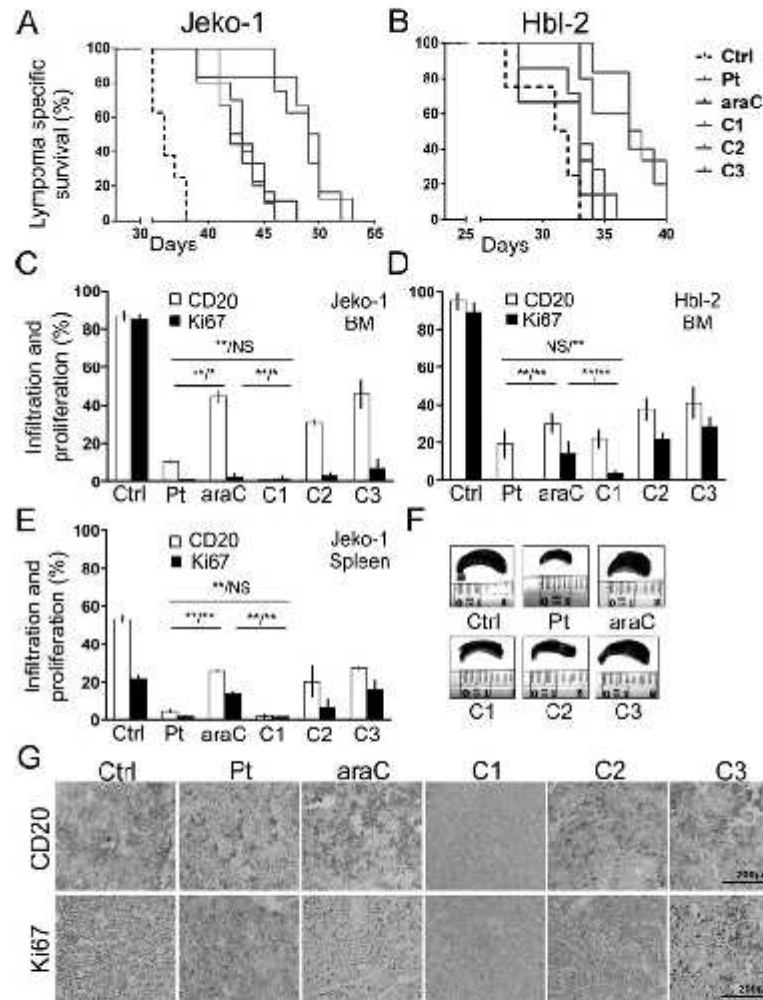


Figure 1. Anti-lymphoma efficacy of araC compared to Pt, and three different combinations of both drugs in mouse xenograft model of MCL. **A-B** Kaplan-Meier survival curves showing lymphoma specific survival of individual treatment cohorts of Jeko-1 (**A**) and Hbl-2 (**B**) xenografted mice. Single-agent cisplatin (Pt) and the C1 combination significantly ($p < 0.05$) prolonged lymphoma specific survival in Jeko-1 and Hbl-2 xenografted mice compared both to untreated mice (Ctrl) and to the other cohorts. **C-E** Results of immunohistochemical analysis showing percent infiltration of murine bone marrow (BM) and spleen with MCL cells (anti-human CD20, white columns), and proliferation rate (Ki67, black columns) of the MCL cells. All 5 treatment approaches significantly ($p < 0.001$) decreased the extent of infiltration (either by % of CD20- or Ki67-positive cells) of murine BM or spleen of Jeko-1 and Hbl-2 xenografted mice compared to untreated controls (Ctrl). Combination of Pt and araC (C1) significantly decreased the extent of infiltration (CD20-positive cells) of murine BM or spleen compared to single agent approaches in Jeko-1 xenografted mice. In case of Hbl-2 xenografted mice either the combination of Pt and AraC (C1) or single-agent Pt significantly decreased the extent of infiltration (CD20-positive cells) of murine BM compared to single-agent AraC. P values are shown for CD20/Ki67, NS- not significant ($p \geq 0.05$), * $p < 0.05$ and ≥ 0.001 , ** $p < 0.001$. **F** Murine spleens removed from the Jeko-1 xenografted mice, both from the untreated animals (Ctrl) and from the mice treated with indicated agent(s). **G** Immunohistochemical analysis (anti-human CD20 and Ki67) of murine spleen of Jeko-1 xenografted mice (untreated controls (Ctrl) and the mice treated with indicated agent(s)).

cohorts (Pt and C1) had both the lowest organ infiltration with human MCL cells (i.e. number of CD20-positive cells), and the most profound suppression of MCL cell proliferation rate (i.e. number of Ki67/MIB1-positive cells, see Figure 1C-E, G and Table 1). Accordingly, spleens isolated from mice treated with either Pt or C1 combination were smaller compared to those isolated from the other cohorts (Figure 1F). Our data indicate that single-agent Pt, or the combination of Pt and araC appear superior to equally toxic doses of single-agent araC in eliminating aggressive MCL cells.

Discussion

Large body of evidence suggests that araC-based strategies are superior to standard CHOP-like-based-only regimen. In addition to combinations of araC and Pt (DHAP), other strategies were tested in attempt to improve outcome of MCL patients. Romaguera et al demonstrated that alternating R-HyperCVAD (cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin and prednisol) and R-high-dose-methotrexate (MTX) / HDAC induced higher CR and prolonged OS compared to historical controls [2]. Another standardly used treatment strategy is the Nordic Regimen induction immunochemo-therapy with rituximab and dose intensified CHOP (maxiCHOP) alternating with R-HDAC. R-maxiCHOP/R-HDAC regimen followed by high dose therapy with ASCT induced high CR rates and the 6-year overall and progression-free survival of 70% and 66%, respectively [3].

As there are currently no randomized trials that would directly compare these different approaches, it remains elusive, which of the agents or strategies are superior in improving outcome of MCL patients: whether hyper-fractionation of cyclophosphamide, dose-intensification of anthracyclines, addition of MTX, addition of Pt, addition of HDAC, or combination of more factors. To answer this question *in extenso* is far beyond the scope of this manuscript. Here, we focused on the simple question, which of the two agents in the DHAP regimen, Pt or araC (or both) are key contributors of improved efficacy of this regimen. Recently, the Nordic Lymphoma Group MCL trial 5 was prematurely terminated because of insufficient antilymphoma efficacy of front-line therapy based solely on high-dose araC in combination with rituximab [8]. To simulate the situation in patients with aggressive MCL disease, we used mouse xenograft models of aggressive metastatic human MCL, and subjected the MCL-bearing mice to equally toxic therapies consisting of Pt, araC and three different combinations of Pt+araC. Equal toxicity of individual treatments was absolute prerequisite that enabled us to compare their anti-lymphoma efficacy. We found that either single-agent Pt or C1 combination (containing the highest dose of Pt compared to C2 or C3 combination) belonged to the most potent treatment approaches. Single-agent araC and C3 combination (the combination with the highest dose of araC) were less effective suggesting araC monotherapy did not effectively suppress aggressive MCL xenografts. In conclusion

using these preclinical models we confirmed the results of the Nordic Lymphoma Group trial 5 concluding that single-agent araC is not appropriate treatment for biologically aggressive MCL in the clinical grounds. In translation the DHAP regimen appears superior to single-agent HDAC-based strategies. The results also indicate that Pt remains, despite its well-known toxic side-effects, a powerful cytostatic agent, at least in case of aggressive forms of MCL.

Acknowledgements: All *in vivo* experiments were performed at the Centre for Experimental Biomodels, 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague. IGA-MZ NT/13072-4, AZV 15-27757A, UNCE 204021, PRVOUK P24/LF1/3, PRVOUK 27/LF1/1, GACR14-19590S.

References

- [1] KHOURI IF, ROMAGUERA J, KANTARJIAN H, PALMER JL, PUGH WC et al. Hyper-CVAD and high-dose methotrexate/cytarabine followed by stem-cell transplantation: an active regimen for aggressive mantle-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 1998; 16: 3803-3809.
- [2] ROMAGUERA JE, PAYAD L, RODRIGUEZ MA, BROGLIO KR, HAGEMMEISTER FB et al. High rate of durable remissions after treatment of newly diagnosed aggressive mantle-cell lymphoma with rituximab plus hyper-CVAD alternating with rituximab plus high-dose methotrexate and cytarabine. *J Clin Oncol* 2005; 23: 7015-7023. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2005.01.1825>
- [3] GEISLER CH, KOLSTAD A, LAURELL A, ANDERSEN NS, PEDERSEN LB et al. Long-term progression-free survival of mantle cell lymphoma after intensive front-line immunochemo-therapy with *in vivo*-purged stem cell rescue: a nonrandomized phase 2 multicenter study by the Nordic Lymphoma Group. *Blood* 2008; 112: 2687-2693. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2008-03-147025>
- [4] DREYLING M, LENZ G, HOSLER E, VAN HOOFF A, GISELBRECHT C et al. Early consolidation by myeloablative radiochemotherapy followed by autologous stem cell transplantation in first remission significantly prolongs progression-free survival in mantle-cell lymphoma: results of a prospective randomized trial of the European MCL Network. *Blood* 2005; 105: 2677-2684. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2004-10-3883>
- [5] LEPRERE F, DELMER A, SUZAN E, LEVY V, BELANGER C et al. Sequential chemotherapy by CHOP and DHAP regimens followed by high-dose therapy with stem cell transplantation induces a high rate of complete response and improves event-free survival in mantle cell lymphoma: a prospective study. *Leukemia* 2002; 16: 587-593. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.leu.2402406>
- [6] HERMINE O, HOSLER E, WALEWSKI J, RIBRAG V, BROUSSE N et al. Alternating Courses of 3x CHOP and 3x DHAP Plus Rituximab Followed by a High Dose ARA-C Containing Myeloablative Regimen and Autologous Stem Cell Transplantation (ASCT) Increases Overall Survival When Compared to 6 Courses of CHOP Plus Rituximab Followed by Myeloablative Radiochemotherapy and ASCT in Mantle Cell Lymphoma: Final Analysis of the MCL Younger Trial of

- the European Mantle Cell Lymphoma Network (MCL net). *ASH Annual Meeting Abstracts* 2002; 120: 151.
- [7] LE GOUILL S, CALLANAN M, MACINTYRE E, DELPAU-LARUE M-H, BODET-MILIN C et al. Clinical, Metabolic and Molecular Responses After 4 Courses of R-DHAP and After Autologous Stem Cell Transplantation for Untreated Mantle Cell Lymphoma Patients Included in the LyMa Trial, a Lysa Study. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2012; 120: 152.
- [8] LAURELL A, KOLSTAD A, JERKEMAN M, RATY R, GEISLER CH. High dose cytarabine with rituximab is not enough in first-line treatment of mantle cell lymphoma with high proliferation: early closure of the Nordic Lymphoma Group Mantle Cell Lymphoma 5 trial. *Leuk Lymphoma* 2014; 55: 1206-1208. <http://dx.doi.org/10.3109/10428194.2013.825906>
- [9] KLANOVA M, SOUKUP T, JAKSA R, MOLINSKY J, LATECKOVA L et al. Mouse models of mantle cell lymphoma, complex changes in gene expression and phenotype of engrafted MCL cells: implications for preclinical research. *Lab Invest* 2014; 94: 806-817. <http://dx.doi.org/10.1038/abinvest.2014.61>

Targeting of BCL2 Family Proteins with ABT-199 and Homoharringtonine Reveals BCL2- and MCL1-Dependent Subgroups of Diffuse Large B-Cell Lymphoma

Magdalena Klanova^{1,2}, Ladislav Andera³, Jan Brazina³, Jan Svadlenka³, Simona Benesova³, Jan Soukup⁴, Dana Prukova¹, Dana Vejmelkova², Radek Jaksa⁵, Karel Helman⁶, Petra Vockova^{1,2}, Lucie Lateckova^{1,2}, Jan Molinsky^{1,2}, Bokang Calvin Lenyeletse Maswabi¹, Mahmudul Alam¹, Roman Kodet⁴, Robert Pytlík², Marek Trnėny², and Pavel Klener^{1,2}

Abstract

Purpose: To investigate the roles of BCL2, MCL1, and BCL-XL in the survival of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL).

Experimental design: Immunohistochemical analysis of 105 primary DLBCL samples, and Western blot analysis of 18 DLBCL cell lines for the expression of BCL2, MCL1, and BCL-XL. Pharmacologic targeting of BCL2, MCL1, and BCL-XL with ABT-199, homoharringtonine (HHT), and ABT-737. Analysis of DLBCL clones with manipulated expressions of BCL2, MCL1, and BCL-XL. Immunoprecipitation of MCL1 complexes in selected DLBCL cell lines. Experimental therapy aimed at inhibition of BCL2 and MCL1 using ABT-199 and HHT, single agent, or in combination, *in vitro* and *in vivo* on primary cell-based murine xenograft models of DLBCL.

Results: By the pharmacologic targeting of BCL2, MCL1, and BCL-XL, we demonstrated that DLBCL can be divided into BCL2-

dependent and MCL1-dependent subgroups with a less pronounced role left for BCL-XL. Derived DLBCL clones with manipulated expressions of BCL2, MCL1, and BCL-XL, as well as the immunoprecipitation experiments, which analyzed MCL1 protein complexes, confirmed these findings at the molecular level. We demonstrated that concurrent inhibition of BCL2 and MCL1 with ABT-199 and HHT induced significant synthetic lethality in most BCL2-expressing DLBCL cell lines. The marked cytotoxic synergy between ABT-199 and HHT was also confirmed *in vivo* using primary cell-based murine xenograft models of DLBCL.

Conclusions: As homoharringtonine is a clinically approved antileukemia drug, and ABT-199 is in advanced phases of diverse clinical trials, our data might have direct implications for novel concepts of early clinical trials in patients with aggressive DLBCL. *Clin Cancer Res* 22(5); 1138–49. ©2015 AACR.

Introduction

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is the most common lymphoma subtype in the Western hemisphere. According to the cell of origin (COO) determined by gene expression profiling (GEP) or several immunohistochemistry (IHC)-based algo-

rithms, DLBCL can be divided into two prognostically different groups: germinal center B-cell-like (GCB) DLBCLs and activated B-cell-like (ABC) DLBCLs, where ABC-DLBCLs are associated with more adverse prognosis (1–3).

Defects in apoptotic signaling represent one of the hallmarks of lymphoid malignancies (4). BCL2 belongs to key regulators of intrinsic apoptosis triggered in response to severe DNA damage or other cellular stresses. Overexpression of BCL2 provides aberrant survival advantage for lymphoma cells and is believed to play one of the key roles in chemoresistance (5–6). Overexpression of BCL2 was repeatedly associated with more adverse outcome to standardly used chemotherapy (7–10). Recently, a phase I dose-escalation study with a highly specific BCL2 inhibitor ABT-199 demonstrated excellent antitumor efficacy in mantle cell lymphoma (MCL) and chronic lymphocytic leukemia (CLL), both of which are known to ubiquitously overexpress BCL2 protein. In contrast, its efficacy in DLBCL was less obvious, as four of eight enrolled patients experienced progression on study treatment (11). Possible therapeutic application of ABT-199 in the treatment of DLBCL thus needs further investigation.

Significance of the other two BCL2 family members, MCL1 and BCL-XL, for the survival of DLBCL remains less clear. Wenzel and colleagues reported higher expression of MCL1 in ABC compared with GCB-DLBCLs (12). The authors suggested that MCL1 might

¹Institute of Pathological Physiology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic. ²First Department of Medicine – Department of Hematology, General University Hospital and Charles University in Prague, Prague, Czech Republic. ³Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Czech Republic. ⁴Department of Pathology and Molecular Medicine, Second Faculty of Medicine, Charles University in Prague and Motol University Hospital, Prague, Czech Republic. ⁵Institute of Pathology, General University Hospital, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic. ⁶Faculty of Informatics and Statistics, University of Economics, Prague, Czech Republic.

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

Corresponding Author: Magdalena Klanova, Institute of Pathological Physiology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic. Phone: 420-22496-5864; Fax: 224-965-916; E-mail: magdalena.klanova@seznam.cz

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1181

©2015 American Association for Cancer Research.

Translational Relevance

Defects in apoptotic signaling including overexpression of BCL2 antiapoptotic proteins contribute to increased survival of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) and might result in selection of resistant clones. Agents specifically blocking the aberrant antiapoptotic signals might result in effective elimination of lymphoma cells. By targeting BCL2 and MCL1 with ABT-199 and homoharringtonine, we demonstrated that DLBCL can be divided into BCL2- and MCL1-dependent subgroups with a less pronounced role for BCL-XL. Derived DLBCL clones with manipulated expressions of BCL2, MCL1, and BCL-XL, and immunoprecipitation experiments confirmed these findings at the molecular level. We demonstrated that concurrent inhibition of BCL2 and MCL1 by ABT-199 and homoharringtonine was highly synergistic *in vitro* and *in vivo* using primary cell-based murine xenograft models. As homoharringtonine is a clinically approved drug and ABT-199 in advanced clinical trials, our data might have direct implications for novel concepts of early clinical trials in patients with DLBCL.

represent a new drug target in this subgroup of DLBCL, which was partially demonstrated in the recent publication by Li and colleagues (13).

Homoharringtonine (HHT, Synribo), originally a plant alkaloid, was recently approved for the therapy of chronic myeloid leukemia (CML) resistant to tyrosine-kinase inhibitors (14). Molecular mechanisms of antitumor activity of HHT appear to be multifactorial, and include downregulation of short-lived proteins, including MCL1 (15). Currently, there is no knowledge on its antitumor activity in lymphomas.

In this study, we investigated the significance of BCL2, MCL1, and BCL-XL for the survival of DLBCL and the outcome of their targeting by various approaches.

Materials and Methods**DLBCL cell lines**

Cell lines were cultured in Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) supplemented with 15% FBS and 1% penicillin/streptomycin. With the exception of HBL1, TMD8, and OCI-Ly2 (kindly provided by Dr. Francisco Hernandez-Ilizaliturri (Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, NY), all the remaining cell lines were purchased from the cell banks (DSMZ, ATCC) and were passaged for fewer than 6 months since their receipt. According to the information provided by the cell banks, the cell lines were authenticated by PCR of short tandem repeat markers confirming unique DNA profiles. HBL1 and TMD8 cells were confirmed to carry heterozygous missense mutations of *CD79B* gene Y196F and Y196H, respectively. OCI-Ly2 cell line has not been authenticated for lack of relevant molecular markers. COO of HBL1 and OCI-Ly2 murine xenografts was confirmed to be of ABC and GCB immunophenotype, respectively (Hans algorithm, data not shown). UPP4D cell line was derived in our laboratory from a patient with treatment-refractory GCB-DLBCL. Sequencing of IGHV confirmed clonal identity of UPP4D with the primary DLBCL cells, from which it was established (data not shown).

Reagents

ABT-199, ABT-737, and HHT were purchased from Selleck Chemicals and R&D Systems.

Cell proliferation/survival assays and apoptosis measurement

DLBCL cells were plated at a cell density of 5,000 cells/0.3 mL and exposed to ABT-199 or HHT. WST-8-based Quick Cell Proliferation Assay Kit (BioVision) was used according to the manufacturer's instructions. Number of apoptotic cells was determined by flow cytometry (BD FACS Canto II) using Annexin V (BD Biosciences). CompuSyn version 1.0 software (ComboSyn) was used to assess drug synergism between ABT-199 and HHT. Combination index (CI) was calculated for different drug combinations (16).

Real-time RT-PCR

Total RNA was isolated from cell lines in Ribozol (Amresco) using phenol-chloroform extraction and from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue samples using High Pure RNA Paraffin Kit (Roche Diagnostics GmbH) according to the manufacturer's instructions. cDNA synthesis was carried out from 1 µg of total RNA with High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (random primers; Applied Biosystems). Real-time RT-PCR was performed using TaqMan Gene Expression Assays (BCL2, Hs00608023_m1, MCL1: Hs01050896_m1, BCL-XL: Hs00236329_m1) on ABI 7900HT detection system (Applied Biosystems). The reference gene was *GAPDH* (Hs02758991_g1).

Western blotting

Western blotting (WB) was performed as previously described (17). Antibodies were obtained from Cell Signaling: BAK (3814), BAX (2774), BCL-XL (2764), BID (2002), BIM (2933), PUMA (4976), cleaved PARP (9541), BCL-6 (4242); ENZO IS/Alexis: CASP3 (ALX-804-305), cFLIP (ALX-804-961); Santa Cruz: Actin-HRP (sc-1616), BAD (sc-8044), MCL1 (sc-819, sc-12756), NOXA (sc-56169), Actin (sc-1615), cMYC (sc-40); or BD Pharmingen: BCL2 (610539). Another MCL1 antibody used for confirmation of WB data was from BioVision (3035-100).

Immunoprecipitation

Cells were lysed in non-denaturing lysis buffer [1% (w/v) Triton X-100], 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 300 mmol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA, 0.02% (w/v) sodium azide supplemented with protease inhibitor cocktail, 2 µmol/L DTT, and 1 mmol/L PMSF for 20 minutes and centrifuged (16,000 × g, 4°C, 15 minutes). Protein concentrations of cell extracts were determined by Pierce BCA Protein Assay Kit and equal amount of protein samples were precleared with protein A-Sepharose bead slurry (Sigma-Aldrich) for 3 × 30 minutes at 4°C, split in half, and incubated with a specific antibody (MCL1 [Santa Cruz, sc-819], BIM [Cell Signaling, 2933], or an isotype control [rabbit polyclonal IgG, Calbiochem]) bound to protein A-Sepharose beads for 1 hour at 4°C. Immunoprecipitates were centrifuged (16,000 × g, 4°C, 5 seconds), washed three times in wash buffer [0.1% Triton X-100, 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 300 mmol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA, 0.02% sodium azide], resuspended in sample buffer, denatured for 5 minutes at 95°C, resolved on a 10%, 12%, or 15% SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting.

Experimental therapy of DLBCL xenografts

In vivo studies were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee. Immunodeficient NOD.Cg-Prkdc^{scid}

Khanova et al

El2g^{cre}/Wt^{fl}/Sz mice (Jackson Laboratory) were maintained in individually ventilated cages. Primary DLBCL-based mouse models designated KTC (treatment refractory DLBCL) and NOVA-313 (DLBCL transformed from CLL) were established in the same way as previously described (18). KTC or NOVA-313 cells were chosen for *in vivo* experiments, because they coexpressed BCL2 and MCL1 (Fig. 5C). The cells were injected intravenously (10×10^6 /mouse) into the tail vein of 8- to 12-week-old female mice on day 1. Therapy with once-weekly intraperitoneal administrations of ABT-199 (500 μ g/dose), HHT (50 μ g/dose), and/or PBS was initiated on day 5. Each treatment group comprised six animals. Animals were euthanized after they developed hind-leg paralysis or generalized inability to thrive (slow movement, tremor, tachypnea, progressive wasting, and other symptoms of advanced disease). Differences in survival between treatment groups were evaluated using Kaplan-Meier survival estimates with Graph-Pad Prism software.

Immunohistochemistry

Sections from FFPE blocks from patients and from murine DLBCL xenografts were cut and stained by hematoxylin and eosin and Giemsa stains. Immunohistochemistry was performed using BCL2 (clone 124; Dako), BCL-XL (clone B4H6; Cell Signaling), MCL1 (clone 5-19; Santa Cruz), and in case of primary DLBCL samples also with following antibodies CD20 (clone L26; Dako), CD5 (clone 4C7; Biogenex), CD10 (clone 56C6; Novocastra), CD23 (clone SP23; Labvision), BCL6 (clone PG-B6p; Dako), MUM1 (clone 1p; Dako), Ki-67 (clone MIB-1; Dako). Heat-induced pretreatment of deparaffinized tissue sections in buffer pH 9.0 (Dako, S2367) was applied. After blocking of endogenous peroxidase activity (3% solution of hydrogen peroxide), samples were incubated overnight at 4°C with primary antibodies anti-MCL1 (1:200) and anti-BCL-XL (1:200). Detection of primary antibody binding was performed for anti-MCL1 with polymer system (secondary antibody and peroxidase; N-Histofine Simple Stain MAX PO; Nichirei Biosciences) and for anti-BCL-XL with biotinylated secondary antibody and avidine-peroxidase complex (ISAB+, Dako REAL Detection Systems, HRP/DAB+, Rabbit/Mouse; Dako), followed by incubation with solution of hydrogen peroxide and chromogen substrate DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride; Dako). Nuclei were counterstained with Harris hematoxylin. After dehydration and clearing in xylene, slides were mounted in organic-solvent-based medium and evaluated under light microscope. To differentiate BCL2, BCL-XL, and MCL1-positive and -negative DLBCL cases, we applied the commonly used cutoff value of 30% cells (12). In case of positive samples, the staining intensity was scored by two expert hematopathologists as 1 (low expression), 2 (intermediate expression), and 3 (high expression; Supplementary Fig. S1).

Establishment of DLBCL clones with knockdown or transgenic overexpression of BCL2, MCL1, or BCL-XL

Cell lines with stably integrated shRNA-gene/cDNA were prepared as follows: packaging lentiviral vectors pMD2.G (Addgene, plasmid 12259), psPAX2 (Addgene, plasmid 12260) together with pLKO.1 (Sigma Aldrich)/pCDH-neo (SB) vector containing the gene of interest were transfected into HEK 293T/17. Conditioned medium was harvested 36 hours later, centrifuged, and precipitated using PEG-it (System Biosciences) according to manufacturer's instructions. Precipitated particles were resuspended in PBS and stored in -80°C . Target cells were infected with equiv-

alent multiplicity of infection (MOI) for 24 hours and the transductants were selected in the growth medium containing 2 to 3 μ g/mL puromycin (LKO1-shRNAs) or 1 mg/mL G-418 (CDH-cDNAs).

Statistical analysis

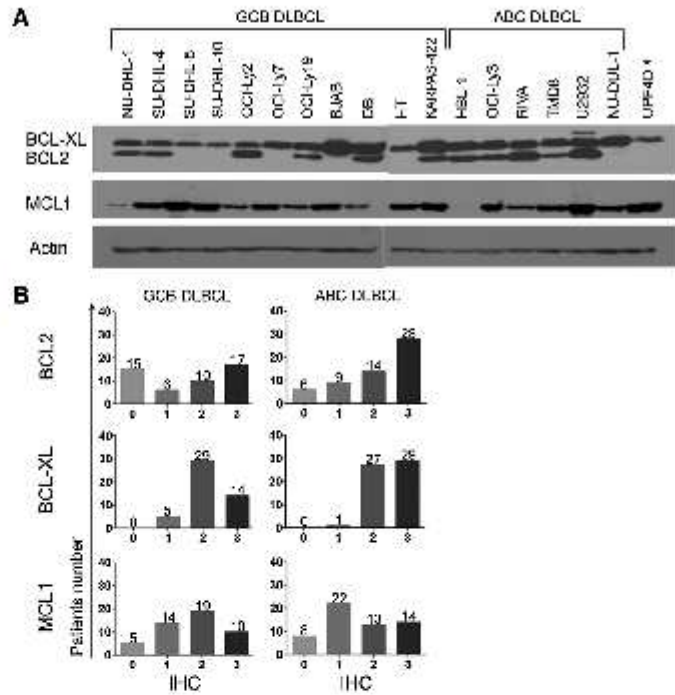
The strength of linear relationship between the expression levels of BCL2, BCL-XL, and MCL1 proteins (evaluated by densitometry of Western blots) and the sensitivity to ABT-199 and HHT (level of apoptosis after 24 hours) was evaluated by Pearson's correlation coefficients (rP). Because our data do not follow the bivariate normal distribution and scatter plot analysis indicated that some of the analyzed relationships are nonlinear (but monotone), Spearman's rank correlation coefficients (rS) were used to assess the statistical significance of the relationships (i.e., to test null hypotheses about no relationship). We also report 95% bootstrap confidence intervals for the Spearman's rank correlation coefficient (1,000 bootstrap replications being employed). Fisher exact test was conducted to analyze the relationship between two categorical variables in a 2×2 contingency table. The significance level of 5% was selected.

Results

DLBCL cell lines and primary samples show similar patterns of expression of BCL2, MCL1, and BCL-XL

Initially, we aimed to determine whether established DLBCL cell lines represent relevant models for the study of BCL2 family proteins. Implementing semiquantitative approaches (western blot and IHC), we analyzed the expression patterns of BCL2, MCL1, and BCL-XL in 18 established DLBCL cell lines (GCB = 12, ABC = 6) and 105 primary DLBCL samples obtained from patients at diagnosis (GCB = 48, ABC = 57). BCL-XL protein was abundantly expressed in all cell lines (Fig. 1A). BCL-XL protein expression in primary samples was also high with 99 of 105 samples (=94.3%) showing intermediate to high expression, with only six samples showing low expression (=5.7%). There were no primary samples negative for BCL-XL in our cohort. Similar to BCL-XL, MCL1 protein was also expressed in all cell lines, however, in two of them (NU-DHL-1 and HBL-1, = 11.1%) its expression was very low (Fig. 1A). Expression of MCL1 in primary DLBCL samples was variable. Although no MCL1 expression was detected in 13 of 105 samples (=12.4%), low, intermediate, and high MCL1 expression was detected in 36 (=34.3%), 32 (=30.4%), and 24 (=22.9%) samples, respectively (Fig. 1B). BCL2 protein was not expressed in 6 of 18 (=33.3%) cell lines, and very low expression was observed in NU-DHL-1 cell line (Fig. 1A). In the remaining 11 cell lines, BCL2 protein was well expressed. BCL2 protein was negative in 21 of 105 (=20%) primary samples, whereas low, intermediate, and high BCL2 protein was expressed in 15 (=14.3%), 24 (=22.8%), and 45 (42.9%) primary samples (Fig. 1B). In the case of BCL2, Fisher exact test was performed (cell lines and primary samples vs. positive and negative BCL2 expressions), resulting in $P = 0.209$ and thus not rejecting the null hypothesis about no differences in proportions at 5% significance level. The data thus confirmed that DLBCL cell lines do represent relevant models for the investigation of the roles of BCL2, MCL1, and BCL-XL in the survival of DLBCL. Interestingly, real-time qRT-PCR analyses documented that all DLBCL cell lines and primary samples (including those with undetectable BCL2 or MCL1 protein expression) expressed

Figure 1.
The expression profiles of BCL2 family proteins in DLBCL cell lines (A) and primary DLBCL samples (B). A, Western blot analysis of BCL-XL, BCL2, and MCL1 proteins in 18 DLBCL cell lines [12 germinal center B-cell-like (GCB) and 6 activated B-cell-like (ABC) DLBCL cell lines]. *, UPP4D cell line is of GCB origin and was derived in our laboratory. B, Immunohistochemical analysis of fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded DLBCL samples obtained from 105 patients (48 GCB and 57 ABC-DLBCL) at diagnosis showing level of expression of BCL2, BCL-XL, and MCL1 protein. The extent of protein expression was evaluated semiquantitatively showing either no expression (0) or various intensity of staining (1-3; see Materials and Methods).



BCL2 or MCL1 mRNA suggesting that posttranscriptional regulation of BCL2 and MCL1 expressions might in DLBCL represent another important regulatory node (data not shown). The protein expression profiles of additional selected regulation of apoptosis in the 18 cell lines are shown in Supplementary Fig. S2.

BCL2-negative DLBCL cell lines are resistant to ABT-199

Significant differences in BCL2 expression in the analyzed DLBCL cell lines prompted us to examine whether they are also reflected in the sensitivity of these cells to ABT-199, a potent BCL2 inhibitor. Using WST-8 cell proliferation/survival assay we indeed confirmed that all six BCL2-negative cell lines (SU-DHL-5, SU-DHL-10, OCI-Ly7, BJAB, HT, and UPP4D), and interestingly also 4 of 12 (=33.3%) BCL2-positive cell lines (SU-DHL-4, DB, Karpas-422, and NU-DUL-1) were resistant to ABT-199 (i.e., survived and proliferated in the medium supplemented with 1 μmol/L ABT-199 considered a clinically relevant plasma concentration; ref. 19). The remaining eight BCL2-positive cell lines (NU-DHL-1, OCI-Ly2, OCI-Ly19, HBL-1, OCI-Ly3, RIVA, TMD8, and U-2932) were sensitive to ABT-199 (Supplementary Fig. S3).

In addition to proliferation assays, we also analyzed ABT-199-triggered activation of apoptosis in all 18 cell lines. Moreover, we also analyzed ABT-737-triggered activation of apoptosis, as ABT-737 is an inhibitor of BCL-XL, BCL2, and BCL-W (Supplementary Fig. S4). The almost identical sensitivity of DLBCL cell lines to

ABT-199 compared with ABT-737 suggested, in correlation with previously published data (20), that inhibition of BCL2, and not BCL-XL, was the principal molecular mechanism of cell death in the sensitive DLBCL cell lines.

We demonstrated statistically significant positive correlation between the level of expression of BCL2 and sensitivity to ABT-199 (sensitivity = the extent of apoptosis after a 24-hour incubation with ABT-199 1 μmol/L; $r_s = 0.667$; $r_p = 0.716$; $P = 0.001$; 95% CI from 0.305 to 0.963), irrespective of the expression levels of BCL-XL or MCL1 proteins. Our results also suggest a weak negative correlation between the expression levels of MCL1 and the sensitivity to ABT-199 ($r_s = -0.11$; $r_p = -0.284$; $P = 0.254$; 95% CI from -0.699 to 0.261). Nonrejection of the null hypothesis at 9% significance level is presumably caused by the low power of the test (small sample size) rather than the absence of an association between the analyzed variables.

MCL1-targeting agent HHT is antiproliferative and proapoptotic in most DLBCL cell lines

In their recent communication, Wenzel and colleagues showed that MCL1 protein is deregulated in a subset of DLBCLs, might contribute to therapy resistance, and thus could represent a relevant druggable target in DLBCL (12). To our best knowledge, there is currently no specific MCL1 inhibitor in clinical practice or advanced clinical development. Among currently approved anti-tumor agents, HHT was persuasively shown to trigger efficient

Khanova et al

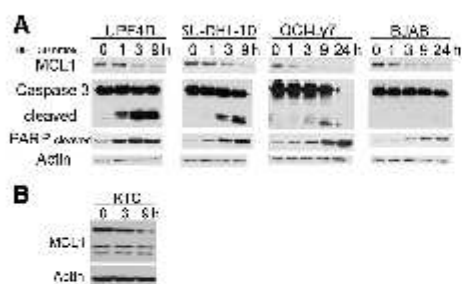


Figure 2. HHT downregulates MCL1 protein and induces apoptosis in DLBCL cell lines (A) and primary cells (B). A, Western blot analysis of MCL1 protein and selected markers of apoptosis [cleaved caspase-3, cleaved poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)] in 4 selected DLBCL cell lines after exposure (0, 1, 3, 9, and 24 hours) to HHT (30 nmol/L). B, Western blot analysis of KTC primary cells isolated from murine spleen 3 and 9 hours following i.p. administration of a single dose of 50 mg HHT.

downregulation of MCL1 protein (15). We confirmed the decreased expression of MCL1 protein after exposure to 30 nmol/L HHT (=a steady-state plasma level in CML patients treated with Symbio) in four HHT-sensitive DLBCL cell lines (Fig. 2A; ref. 21). In these cells, HHT also triggered proapoptotic signaling including processing of CASP3 and its target PARP. In addition to *in vitro* experiments, the downregulation of MCL1 as a result of treatment with HHT was also confirmed *in vivo* using a primary cell-based mouse xenograft model of DLBCL (KTC model; Fig. 2B). Besides downregulation of MCL1, we identified other molecular changes associated with exposure of DLBCL cell lines to HHT including downregulation of MYC, BCL6, or cFLIP (Supplementary Fig. S5). These changes, however, were not detected in all analyzed cell lines (unlike downregulation of MCL1). Nevertheless they might contribute to the cytotoxicity of HHT toward DLBCL cells at least in some cell lines. Similarly as for ABT-199 we also determined long-term survival of HHT-treated DLBCL cells. As HHT-resistant were taken those cells that survived/proliferated in the medium supplemented with 30 nmol/L HHT (Supplementary Fig. S3). With a borderline exception of DB, all other DLBCL cells were HHT sensitive. These HHT-prone cells also demonstrated increased apoptosis as documented in the Supplementary Fig. S4. Cell cultures containing >50% apoptotic cells following their 24-hour exposure to 30 nmol/L HHT were defined as HHT-high sensitive, whereas those with less than 50% apoptotic cells as HHT-low sensitive.

We demonstrated statistically significant negative correlation between the expression levels of BCL2 protein and the sensitivity to HHT (sensitivity = the extent of apoptosis after 24 hours of incubation with HHT 30 nmol/L; $r_1 = -0.562$; $r_2 = -0.674$; $P = 0.003$; 95% CI from -0.862 to -0.311). A weak negative correlation with the sensitivity to HHT was also found for BCL-XL ($r_1 = -0.365$; $r_2 = -0.35$; $P = 0.168$; 99% CI from -0.763 to 0.223). Nonrejection of the null hypothesis at 5% significance level may be caused by the low power of the test (small sample size) rather than the absence of an association between the analyzed variables. The expression levels of MCL1 protein did not correlate with the sensitivity to HHT.

Transgenic overexpression or targeted knockdown of BCL2 proteins impacts viability and sensitivity of DLBCL cells to ABT-199 and/or HHT

The results obtained from the treatment of the cell lines with ABT-199 and HHT suggested that DLBCL can be divided into different BCL2- and/or MCL1-dependent categories (Fig. 6 and Supplementary Table S2). To further investigate the significance of BCL2, MCL1, and BCL-XL for the survival of DLBCL, we established DLBCL clones with targeted downregulation or transgenic overexpression of these proteins and corresponding control cells [expressing either nonsilencing (NS) shRNAs or an empty pCDH vector; Fig. 3A, D, G, I, M, and P]. In all apoptosis assays, the clones with manipulated expression of BCL2 proteins were compared with the corresponding controls.

BCL2

Knockdown of BCL2 expression in OCI-Ly2 cells that are highly sensitive to ABT-199 was lethally toxic (repeated attempts, data not shown). U2932^{shBCL2} clone derived from ABT-199-sensitive cell line demonstrated increased sensitivity to ABT-199 compared with U2932^{shNS}. Response of DB^{shBCL2} clone derived from ABT-199 resistant to ABT-199 was not changed. Both these clones, however, became sensitized to HHT (Fig. 3B and C). Resistance of SU-DHL-5^{BCL2-cDNA} and UPF4D^{BCL2-cDNA} clones with the increased BCL2 expression to ABT-199 did not change compared with corresponding controls, but they became markedly resistant to HHT (Fig. 3E and F). To elucidate the molecular mechanisms responsible for the acquired resistance of SU-DHL-5^{BCL2-cDNA} to HHT compared with SU-DHL-5^{empty-vec} cells, we performed immunoprecipitation of both cell populations with anti-BIM antibody in unexposed cells and in cells exposed to HHT. We detected BCL2 protein bound on BIM in SU-DHL-5^{BCL2-cDNA} cells. Importantly, higher amounts of BCL2 were bound on BIM after exposure of the cells to HHT compared with HHT-unexposed cells (2.45-fold higher according to densitometry; Fig. 4B).

MCL1

Knockdown of MCL1 expression in the HHT-high-sensitive UPF4D cell line was lethally toxic (repeated attempts, data not shown). Karpas-422^{shMCL1} clone derived from the HHT-high-sensitive cell line had increased sensitivity to HHT, but unchanged sensitivity to ABT-199. U2932^{shMCL1} clone derived from the HHT-low-sensitive cell line demonstrated mildly decreased sensitivity to HHT, and increased sensitivity to ABT-199 (Fig. 3H and I). NU-DHL-1^{MCL1-cDNA} ectopically expressing MCL1 became more resistant to HHT, but demonstrated no significant change in sensitivity to ABT-199. HBL1^{MCL1-cDNA} clone showed no change in susceptibility to HHT or ABT-199 (Fig. 3K and L).

BCL-XL

Knockdown of BCL-XL expression was achieved in all tested cell lines. BJAB^{shBCL-XL} and DB^{shBCL-XL} clones demonstrated significantly increased sensitivity to HHT, and mildly increased sensitivity to ABT-199 (Fig. 3N and O). SU-DHL-5^{BCL-XL-cDNA} and UPF4D^{BCL-XL-cDNA} clones had decreased sensitivity to HHT, and remained resistant to ABT-199 (Fig. 3Q and R). Moreover, both UPF4D and SU-DHL-5 cells with acquired resistance to HHT demonstrated increased BCL-XL expression (Supplementary Fig. S6).

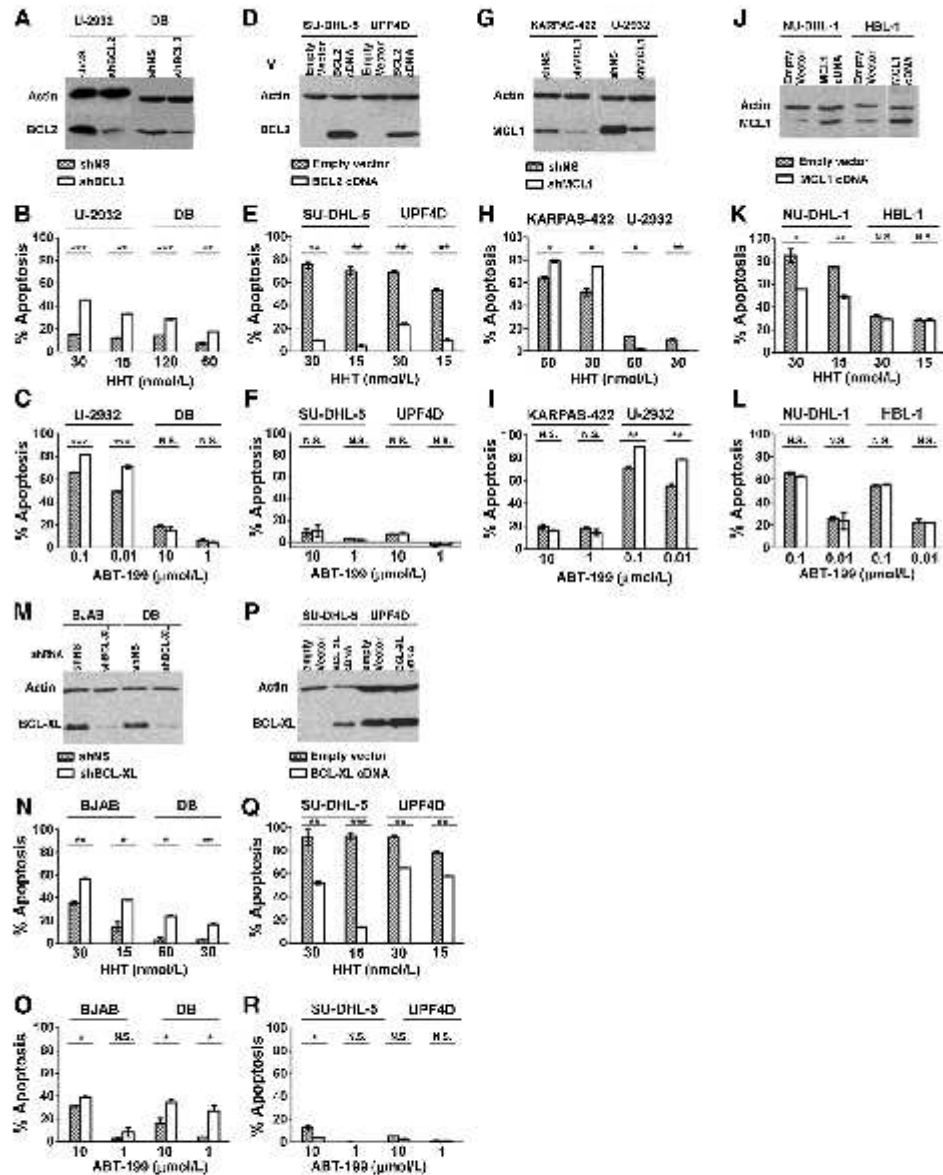


Figure 3. Transgenic overexpression or targeted knockdown of BCL2 (A-F), MCL1 (G-I), and BCL-XL (M-R) proteins impact sensitivity of DLBCL cells to ABT-199 and HHT. Western blot analysis of BCL2 (A, D), MCL1 (G, J), and BCL-XL (M, P) proteins in DLBCL clones and their corresponding controls. The extent of apoptosis following 24-hour exposure to HHT or ABT-199 is shown. N.S., not significant; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

Kinova et al

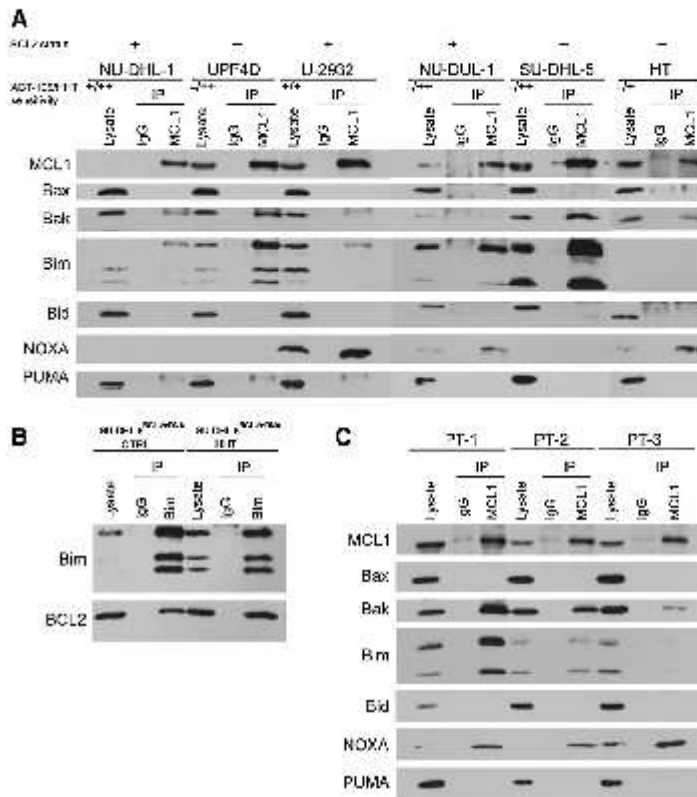


Figure 4. BH3-only proteins bound to MCL1 determine MCL1-dependence of DLBCL cells. **A**, Immunoprecipitation (IP) of MCL1 protein and protein analysis (by Western blot) of MCL1 binding partners in six selected DLBCL cell lines with different sensitivities to HHT. High amount of Bim bound to MCL1 protein was detected in HHT-high-sensitive cell lines NU-DHL-1, U2932, NU-DHL-1, and SU-DHL-5. An interaction of MCL1 protein with NOXA and in much lesser extent with BAK or BIM is seen in 2 HHT-low-sensitive cell lines U2932 and HT. BCL2 status and sensitivity of DLBCL cell lines to ABT-199 (+/-, sensitive/resistant) or HHT (+/+/-, high-sensitive/low-sensitive/resistant) are depicted with symbols. **B**, IP of Bim and protein analysis of Bim binding partners in SU-DHL-5^{BCL2-DNA} clone with ectopic expression of BCL2 before and after exposure to HHT demonstrates higher amounts of BCL2 protein bound to Bim after exposure to HHT. **C**, analysis of MCL1 complexes in primary DLBCL cells obtained from three patients (PT) at diagnosis of DLBCL. Interactions of MCL1 protein with Bim, BAK, or NOXA are shown.

BH3-only proteins bound to MCL1 determine MCL1 dependence of DLBCL cell lines

MCL1 and BCL2 proteins protect cells from apoptosis by sequestering diverse proapoptotic BH3-only proteins and by blocking proapoptotic BAX/BAK proteins (22–23). Thus, the analysis of their binding partners could provide additional information on their cell-specific function. The immunoprecipitation of MCL1 complexes uncovered high amounts of BH3-only protein BIM bound to MCL1 protein in the HHT-high-sensitive cell lines U2932, NU-DHL-1, SU-DHL-5, and NU-DHL-1 (Fig. 4A). In concordance with Wenzel and colleagues, we confirmed attenuated interaction of MCL1 with BIM (but increased amount of NOXA) in the HHT-low-sensitive U2932. In the other HHT-low-sensitive, BIM-nonexpressing HT we also co-immunoprecipitated NOXA (Fig. 4A; Supplementary Fig. S2; ref. 12). In contrast to BAX and BID, BAK co-immunoprecipitated with MCL1 in majority of analyzed DLBCL cell lysates (Fig. 4A). Analogous MCL1 complexes were formed in three analyzed primary DLBCL cells—depending on the level of expression they

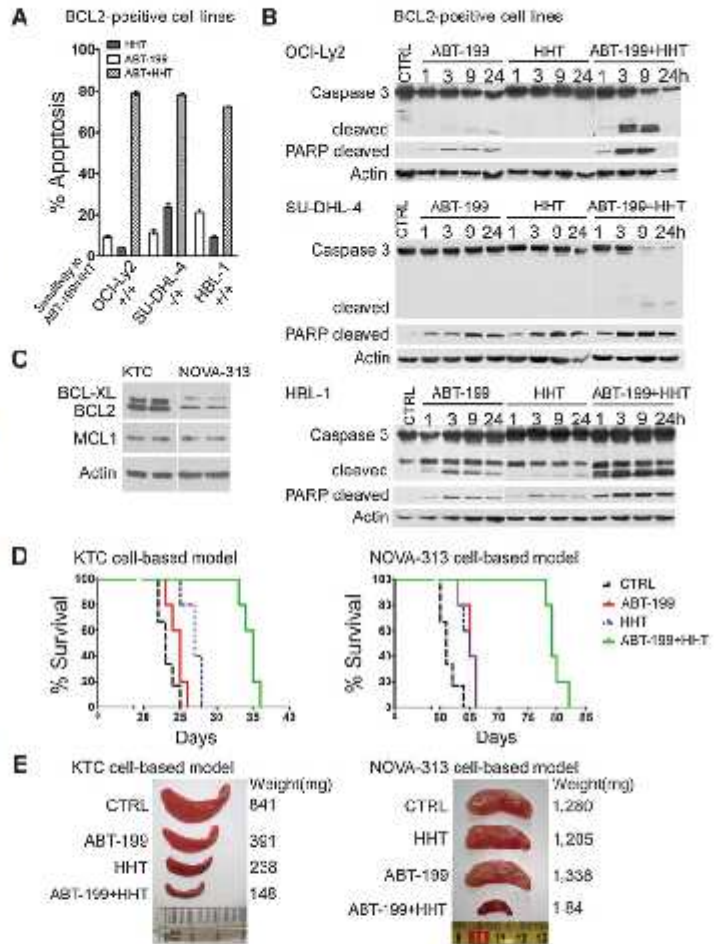
contained BIM, NOXA, and BAK, but not BID, BAX, or PUMA (Fig. 4C).

HHT synergizes with ABT-199 in eliminating BCL2-positive DLBCL cells

HHT and ABT-199 target different key molecules involved in the survival of DLBCL. We therefore asked, whether combining HHT and ABT-199 in the 18 DLBCL cell would elicit additive or even synergistic cytotoxic effect. We demonstrated cytotoxic synergy between HHT and ABT-199 in most of the tested BCL2-positive cell lines (8 of 12, 66.7%; see Fig. 5A and B), whereas in the remaining 4 of 12 BCL2-positive cell lines (OCI-Ly3, TMD8, RIVA, and Karpas-422) additive cytotoxic effect was observed (data not shown). With the exception of OCI-Ly7 no benefit of combining HHT and ABT-199 was observed in BCL2-negative cell lines (5 of 6, 83.3%; data not shown). Cytotoxic synergy between ABT-199 and HHT was confirmed in selected DLBCL cell lines using the CI (in HBL1 cell line: 0.0131 < CI < 0.02683; in SU-DHL-4 cell line: 0.03612 < CI < 0.25985; ref. 16).

Figure 5.

HHT in combination with ABT-199 is highly synergistic *in vitro* and *in vivo*. **A**, the extent of apoptosis following 24-hour exposure to ABT-199, HHT, or combination of both agents in OCI-Ly2, SU-DHL-4, and HBL-1 cell lines demonstrates marked synergism of the combination compared with single-agent approaches. Cytotoxic synergy between ABT-199 and HHT was confirmed in selected DLBCL cell lines using the CI (in HBL-1 cell line 0.0331 < CI < 0.02683; in SU-DHL-4 cell line 0.03612 < CI < 0.29865). The doses of ABT-199 and HHT were chosen to maximize the synergistic effect of the drug combination and were different for particular cell lines: OCI-Ly2, SU-DHL-4 (ABT-199 0.1 μmol/L, HHT 30 nmol/L), HBL-1 (ABT-199 0.01 μmol/L, HHT 15 nmol/L). Sensitivity of OCI-Ly2, SU-DHL-4, and HBL-1 cell lines to ABT-199 (+/-, sensitive/resistant) or HHT (+/+/-, high-sensitive/low-sensitive/resistant) is depicted with symbols. **B**, Western blot analysis of selected markers of apoptosis in OCI-Ly2, SU-DHL-4, and HBL-1 cells after exposure (1, 3, 9, and 24 hours) to ABT-199, HHT, or combination of both agents. **C**, Western blot analyses of KTC and NOVA-313 primary DLBCL cells in duplicate demonstrate coexpression of BCL2 and MCL1 in both cell types. **D**, Kaplan-Meier survival curves demonstrate statistically significant prolongation of survival of the mice treated with the combinatorial therapy using ABT-199 and HHT compared with the corresponding monotherapies or untreated controls. **E**, spleen weights obtained from one mouse from each treatment cohort (compared to untreated CTRL) at the time of lymphoma-specific demise of the first untreated control confirms the synergistic efficacy of ABT-199 and HHT compared with monotherapies.



HHT in combination with ABT-199 significantly prolongs overall survival of primary DLBCL xenograft-bearing mice compared with single-agent approaches

To confirm the observed anti-DLBCL synergism between HHT and ABT-199 *in vivo*, we used two primary cell-based mouse xenograft models of DLBCL known to coexpress BCL2 and MCL1 proteins (established in our laboratory and designated KTC and NOVA-313; Fig. 5C). It must be emphasized that the primary endpoint of these *in vivo* experiments was not single-agent efficacy of ABT-199 or HHT monotherapies given at maximum tolerated doses (which would have required higher dosing and more dense administrations of either agent), but the confirmation of the *in*

in vitro shown synergism at relatively low, nontoxic doses (Fig. 5A and B). In the KTC model (derived from a patient with treatment refractory DLBCL), HHT in combination with ABT-199 significantly prolonged overall survival (OS) compared with untreated animals ($P = 0.0012$) or compared with HHT ($P = 0.0026$) or ABT-199 monotherapy ($P = 0.0021$; Fig. 5D). In the NOVA-313 model (derived from a patient with the transformation of CLL into DLBCL), HHT in combination with ABT-199 significantly prolonged OS compared with the untreated controls ($P = 0.0012$) or both single-agent approaches ($P = 0.0026$ and 0.0027 for ABT-199 and HHT, respectively; Fig. 5D). Spleen weights obtained from mice treated with the combination of both agents were

Kinova et al

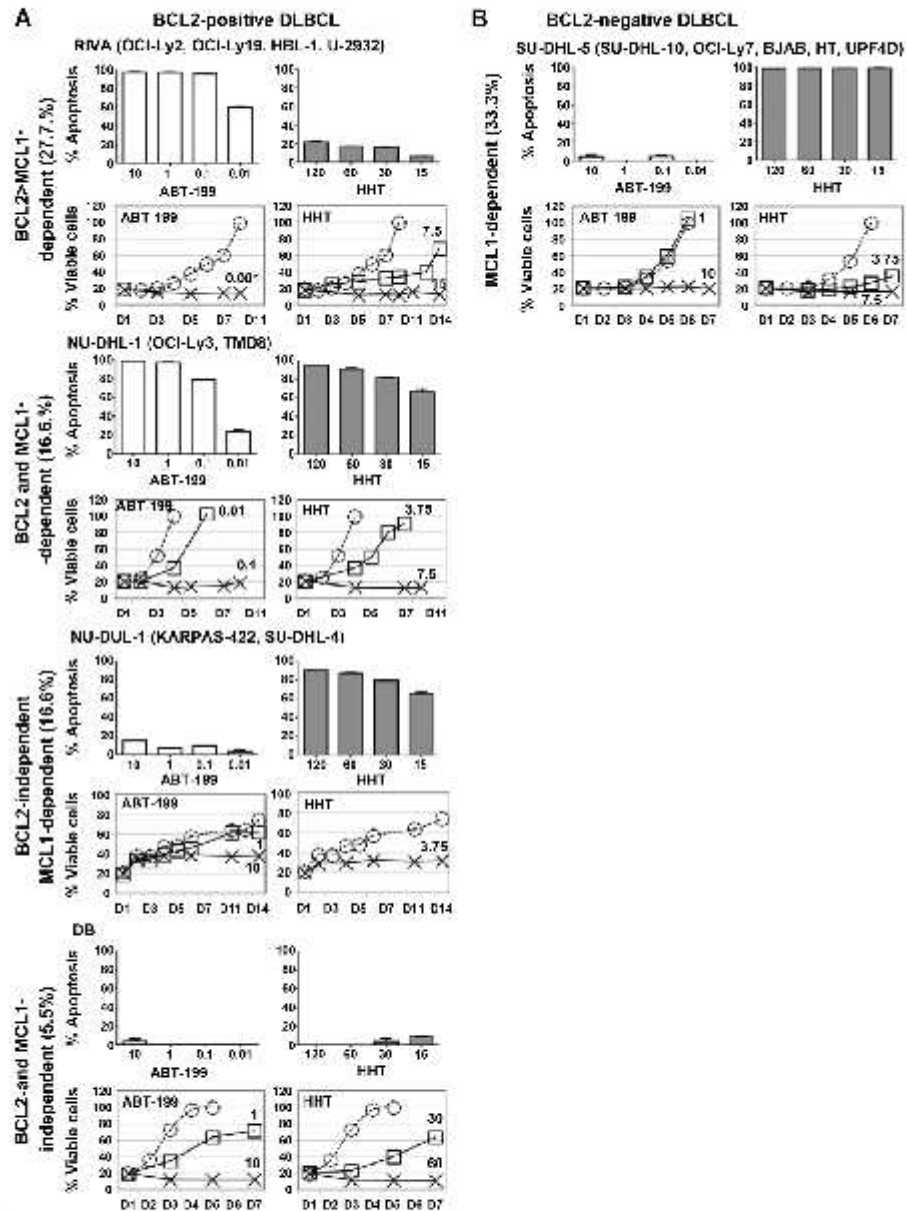


Figure 6. Suggested division of DLBCL into BCL2-dependent and/or MCL1-dependent subgroups. Based on the sensitivity to ABT-199 and HHT (determined either by the extent of apoptosis following 24-hour exposure to ABT-199 or HHT, or assessed by cell survival/proliferation assay), the 18 tested DLBCL cell lines can be divided into BCL2- and/or MCL1-dependent categories. Although BCL2-positive DLBCL cell lines are BCL2-dependent and/or MCL1-dependent (A), BCL2-negative DLBCL cell lines appear exclusively MCL1-dependent (B). Only 1 DLBCL cell line was resistant to both agents (DB) indicating its independence to inhibition of both BCL2 and MCL1.

significantly smaller compared with spleens obtained from untreated controls or mice treated with single-agent approaches (Fig. 5E).

Discussion

Targeted inhibition of BCL2 with its highly selective inhibitor ABT-199 recently emerged as a promising treatment strategy for some B-cell malignancies such as CLL and MCL, but its possible application in DLBCL seems to be less obvious (24). It must be emphasized that a substantial part of DLBCL cases lack BCL2 by standard IHC analysis (10). Moreover, the expression status of BCL2 in the reported clinical trials with ABT-199 was not specified (11).

We analyzed 18 established DLBCL cell lines as relevant substitutes for primary DLBCL samples to evaluate the role of major antiapoptotic proteins BCL2, MCL1, and BCL-XL in the survival of DLBCL. As previously suggested, we also demonstrated that the lack of BCL2 protein expression was associated with resistance to ABT-199 (ref. 25; Fig. 1; and Supplementary Fig. S3). In translation, the data indicate that ABT-199-based therapy should be avoided in BCL2-negative DLBCL patients. However, ABT-199 might prove effective (or even highly effective) in a subgroup of BCL2-positive DLBCL, the larger part of which appears to depend (at least partially) on BCL2 for survival. The almost identical sensitivity of DLBCL cell lines to ABT-199 compared with ABT-737 (Supplementary Fig. S4) suggested, in agreement with previously published data (20), that inhibition of BCL2, and not BCL-XL, was the principal molecular mechanism of cell death in the sensitive cell lines.

IHC analysis of 105 FFPE primary DLBCL samples and Western blot analysis of 18 DLBCL cell lines demonstrated high ubiquitous expression of BCL-XL protein in DLBCL. Compared with previously published data, our own results demonstrated somewhat higher expression of MCL1 protein in DLBCL cell lines and primary samples (Fig. 1A and B; refs. 12–13). To confirm our data, the protein expression of MCL1 in the cell lines was verified using another anti-MCL1 antibody with the same results (data not shown). We also confirmed that IHC analysis of subcutaneous murine xenografts of selected DLBCL cell lines for MCL1 protein expression corresponded well with Western blot analysis of the cell lysates (Supplementary Table S1). We must, however, emphasize that both Western blot and IHC are semiquantitative methods, and potential differences in the technical aspects and interpretation of the data might play central roles in the observed differences between our results and the work of other groups.

Based on the sensitivity to ABT-199 and HHT, the 18 tested DLBCL cell lines could be divided into three categories (Fig. 6 and Supplementary Table S2). Nine DLBCL cell lines (SU-DHL-4, SU-DHL-5, SU-DHL-10, OCI-LY-7, BJAB, HT, Karpas-422, NU-DHL-1, and U2932) were sensitive to HHT, but resistant to ABT-199 suggesting their predominant MCL1 dependence. From the eight DLBCL cell lines sensitive to both agents, five cell lines (RIVA, OCI-Ly2, OCI-Ly19, HBL-1, and U-2932) were significantly more susceptible to ABT-199 compared with HHT, suggesting their predominant BCL2 dependence. The remaining three DLBCL cell lines (NU-DHL-1, OCI-Ly3, and TMD8) appeared markedly sensitive to both agents, suggesting their parallel BCL2 and MCL1 dependence. Interestingly, only a single DLBCL cell line (DB) was resistant to both agents.

Results from the DLBCL clones with manipulated expression of BCL2 family members confirmed the suggested division of DLBCL

into predominantly BCL2-dependent and/or MCL1-dependent subgroups with a minor role left for BCL-XL. Downregulation and upregulation of BCL-XL increased and decreased sensitivity to HHT, respectively (Fig. 3), suggesting that BCL-XL could function as general or background anti-apoptotic cushion in DLBCL cells. In addition, acquired resistance of DLBCL cells to HHT was associated with upregulation of BCL-XL protein (Supplementary Fig. S6). We could deduce from these results that acquired overexpression of BCL-XL might suppress MCL1 dependence of DLBCL cells.

Overexpression of BCL2 in BCL2-negative DLBCL cell lines (U2932, SU-DHL-5) did not affect resistance of the derived clones to ABT-199, which is in concordance with the previous communication by Deng and colleagues for ABT-737 (20). However, the upregulated BCL2 protein significantly decreased apoptosis induced by HHT (Fig. 3). We proved that transgenic expression of BCL2 can serve as a buffer for a apoptosis-triggering protein BIM after it is released from MCL1 as a result of MCL1 downregulation upon exposure of the cells to HHT (Fig. 4B). In addition, overexpression of BCL2 might also buffer the additional proapoptotic activities induced by HHT (specified in Supplementary Fig. S5). The data thus at least partially explain molecular basis of the observed trend to increased sensitivity of BCL2-negative DLBCL cell lines to HHT compared with BCL2-positive cell lines (61.9±28.7% vs. 38.2±32.3% average level of apoptosis after 24 hours of incubation with 30 nmol/L HHT, $P = 0.07$).

Although BCL2 dependence of DLBCL can conclusively be determined by the highly-specific BCL2-inhibitor ABT-199, MCL1-dependence is more difficult to assess due to the lack of MCL1-specific inhibitors. Based on the data obtained from the clones with manipulated MCL1 expression derived from the HHT-high-sensitive cell line Karpas-422 and the HHT-low-sensitive cell line U2932, it appears that only HHT-high-sensitive cell lines are predominantly ("truly") MCL1 dependent (Fig. 3), whereas cell death observed in HHT-low-sensitive cell lines might be a result of additional antitumor activities of HHT (Supplementary Fig. S5). This hypothesis was further confirmed by immunoprecipitation experiments, which demonstrated that only in HHT-high-sensitive DLBCL cell lines (U2932, SU-DHL-5, NU-DHL-1, NU-DHL-1) MCL1 protein sequesters apoptosis-activator BIM. In contrast, MCL1 complexes isolated from the HHT-low-sensitive cell lines U-2932 and HT bound predominantly high amounts of the apoptosis-sensitizer NOXA (Fig. 4A). It has been previously shown that only cells harboring antiapoptotic BCL2 proteins (such as MCL1) that are occupied by apoptosis-activator BH3-only proteins were "primed for death" and specifically depend on the antiapoptotic BCL2 proteins for survival (22).

Our data thus indicate that DLBCL can be divided into BCL2-dependent and/or MCL1-dependent subgroups (Fig. 6). Although the BCL2-positive subgroup comprises both BCL2- and MCL1-dependent cells that might be targeted by ABT-199, HHT, or the combination of both agents (with a marked synergistic efficacy), the BCL2-negative DLBCL subgroup appears to be predominantly (if not exclusively) MCL1 dependent. As previously proposed by others, our data thus confirmed that MCL1 indeed is a promising druggable target in DLBCL. In our study we used HHT to target MCL1. In their recent publication in Leukemia, Li and colleagues used other anticancer agents to downregulate MCL1 including cyclin-dependent kinase inhibitor dinaciclib and standardly used cytostatics (doxorubicin, etoposide, cytarabine; ref. 13). However,

Klanova et al

all these agents (like HHT used in our study) have broad spectra of anticancer activities that go far beyond downregulation of MCL1. Nevertheless our data suggest that HHT works specifically through inhibition of MCL1 at least in the HHT-high-sensitive DLBCL cells.

In conclusion, ABT-199 might still prove effective anti-DLBCL agent, but only in the subgroup of BCL2-positive DLBCL. However, HHT appears to be a promising antilymphoma agent for DLBCL irrespective of BCL2 expression status, despite the fact that it after all appears more effective in the BCL2-negative DLBCL. Most importantly, the concurrent inhibition of BCL2 and MCL1 (in our hands by ABT-199 and HHT) induces significant synthetic lethality in most BCL2-positive DLBCL cell lines (Fig. 5A and B), and might represent a new treatment strategy for this subgroup of DLBCL as confirmed also *in vivo* on murine xenograft models based on xenotransplantation of primary DLBCL cells coexpressing BCL2 and MCL1 (Fig. 5C-E). As HHT is a clinically approved antitumor drug and ABT-199 is in advanced phases of clinical testing in diverse malignancies, our data might have direct implications for novel concepts of experimental therapy of DLBCL targeted at BCL2 and/or MCL1 using HHT and ABT-199, single-agent, or in combination.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

I. Andera is an employee of Apogenex Ltd. and Institute of Biotechnology AS CR. No potential conflicts of interest were disclosed by the other authors.

Authors' Contributions

Conception and design: M. Klanova, P. Kleiser

Development of methodology: M. Klanova, J. Soukup, K. Helman, R. Kodet

References

- Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lacroix ES, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000;403:508-11.
- Hans CP, Weisenburger DD, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 2004;103:275-82.
- Choi WW, Weisenburger DD, Gascoyne RD, Piris MA, Ruanhan AH, Delabie J, et al. A new immunoscore algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy. *Clin Cancer Res* 2009;15:5494-502.
- Steiner A, Coy S, Adams JM. Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases. *EMBO J* 2011;30:3667-83.
- McDonnell TJ, Deane N, Platt FM, Nemez G, Jaeger U, McKean JF, et al. BCL-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* 1989;57:79-88.
- Vaux DJ, Coy S, Adams JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 1988;335:440-2.
- Hermine O, Haioun C, Lepage E, d'Agay MF, Briere J, Laviigne C, et al. Prognostic significance of bcl-2 protein expression in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA). *Blood* 1996;87:265-72.
- Hill ME, MacLennan KA, Cunningham DC, Vaughan Hudson B, Burke M, Clarke P, et al. Prognostic significance of BCL-2 expression and bcl-2 major breakpoint region rearrangement in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma: a British National Lymphoma Investigation Study. *Blood* 1996;88:3046-51.
- Kramer MH, Hermans J, Wijnberg E, Philippo K, Goosen E, van Krieken JH, et al. Clinical relevance of BCL2, BCL6, and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 1998;92:3152-62.
- Gascoyne RD, Adami SA, Krajewski S, Krajewska M, Hottelmann DE, Tolcher AW, et al. Prognostic significance of Bcl-2 protein expression and Bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997;90:244-51.
- David M, Seymour JF, Goettschalk JF, Kahl B, Pagel J, Wenzel W, et al. The single-agent Bcl-2 inhibitor ABT-199 (GDC-0199) in patients with relapsed/refractory (R/R) non-Hodgkin lymphoma (NHL): responses observed in all mantle cell lymphoma (MCL) patients. *Blood* 2013;122:1789.
- Wenzel SS, Gray M, Mavris C, Hallinger S, Wolf A, Madle H, et al. MCL1 is downregulated in subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia* 2013;27:1381-90.
- Li J, Pongtornpipat P, Tian T, Kendrick SL, Park S, Penick DC, et al. Synergistic induction of apoptosis in high-risk DLBCL by BCL2 inhibition with ABT-199 combined with pharmacologic loss of MCL1. *Leukemia* 2015;29:1702-12.
- Quintas-Cardama A, Kantafian H, Garcia J. Homoharringtonine, omacetaxine, mepesinacine, and chronic myeloid leukemia *in vivo* 2009. *Cancer* 2009;115:5382-93.
- Chen R, Guo L, Chen Y, Jiang Y, Wenzel W, Phamkiet W. Homoharringtonine reduced Mcl-1 expression and induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011;117:156-64.
- Chou TC. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res* 2010;70:440-6.
- Klanova M, Lorkova I, Vit O, Maswabi B, Molinsky J, Popovikova J, et al. Downregulation of deoxyribosylase kinase in cytarabine-resistant mantle cell lymphoma cells confers cross-resistance to nucleoside analogs gemcitabine, fludarabine and cladribine, but not to other classes of anti-lymphoma agents. *Mol Cancer* 2014; 13:159-72.
- Klanova M, Soukup T, Jakes R, Molinsky J, Lateckova I, Maswabi BC, et al. Mouse models of mantle cell lymphoma, complex changes in gene expression and phenotype of engrafted MCL cells: implications for pre-clinical research. *Lab Invest* 2014;94:806-17.
- David M, Seymour J, Goettschalk J, Kahl B, Pagel J, Wenzel W, et al. The Bcl-2 inhibitor ABT-199 (GDC-0199) is active and well tolerated in

- patients with relapsed/refractory mantle cell lymphoma (MCL) and other non-Hodgkin lymphomas (NHL). *Haematologica (EHA Congress Abstracts)* 2014;98:355-56.
20. Deng J, Carlson N, Takeyama K, Dai C, Jin P, Shipp M, Lezai A. BH3 profiling identifies three distinct classes of apoptotic blocks to predict response to ABT-737 and conventional chemotherapeutic agents. *Cancer Cell* 2007; 12:171-85.
 21. Nemunaitis J, Mita A, Stephenson J, Mita MM, Samantopoulos J, Padmanabhan-Jyer S, et al. Pharmacokinetic study of oxycetaxine mesoparticle administration subcutaneously to patients with advanced solid and hematologic tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 2013;71: 35-41.
 22. Certo M, Del Gaizo Moore V, Nishino M, Wei G, Konneyer S, Armstrong SA, et al. Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell* 2006;9:351-65.
 23. Lotai A, Resnik MC, Walensky LD, Scorsone MI, Weiler S, Konneyer SJ. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2002; 2:183-92.
 24. Davids MS, Roberts AW, Anderson MA, Pagel JM, Kahl B, Gerecitano JF, et al. The BCL-2-specific BH3-mimetic ABT-199 (GDC-0199) is active and well-tolerated in patients with relapsed non-Hodgkin lymphoma: interim results of a phase I study. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2012;120:304.
 25. Sosun AJ, Leisenow JD, Boghauer ER, Achler SL, Cannon ND, Chen J, et al. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat Med* 2013;19:202-8.

RESEARCH

Open Access

Downregulation of deoxycytidine kinase in cytarabine-resistant mantle cell lymphoma cells confers cross-resistance to nucleoside analogs gemcitabine, fludarabine and cladribine, but not to other classes of anti-lymphoma agents

Magdalena Klanova^{1,2}, Lucie Lorkova¹, Ondrej Vit¹, Bokang Masvabi¹, Jan Molinsky^{1,2}, Jana Pospisilova¹, Petra Vockova^{1,2}, Cory Mavis³, Lucie Latekova^{1,2}, Vojtech Kulvait¹, Dana Vejmelkova², Radek Jaks³, Francisco Hernandez⁴, Marek Trnery², Martin Vokurka¹, Jiri Petrak^{1,5†} and Pavel Klener Jr^{1,2†}

Abstract

Background: Mantle cell lymphoma (MCL) is an aggressive type of B-cell non-Hodgkin lymphoma associated with poor prognosis. Implementation of high-dose cytarabine (araC) into induction therapy became standard-of-care for all newly diagnosed younger MCL patients. However, many patients relapse even after araC-based regimen. Molecular mechanisms responsible for araC resistance in MCL are unknown and optimal treatment strategy for relapsed/refractory MCL patients remains elusive.

Methods: Five araC-resistant (R) clones were derived by long-term culture of five MCL cell lines (CTRL) with increasing doses of araC up to 50 microM. Illumina BeadChip and 2-DE proteomic analysis were used to identify gene and protein expression changes associated with araC resistance in MCL. *In vitro* cytotoxicity assays and experimental therapy of MCL xenografts in immunodeficient mice were used to analyze their relative responsiveness to a set of clinically used anti-MCL drugs. Primary MCL samples were obtained from patients at diagnosis and after failure of araC-based therapies.

Results: Marked downregulation of deoxycytidine-kinase (DCK) mRNA and protein expression was identified as the single most important molecular event associated with araC-resistance in all tested MCL cell lines and in 50% primary MCL samples. All R clones were highly (20-1000x) cross-resistant to all tested nucleoside analogs including gemcitabine, fludarabine and cladribine. *In vitro* sensitivity of R clones to other classes of clinically used anti-MCL agents including genotoxic drugs (cisplatin, doxorubicin, bendamustine) and targeted agents (bortezomib, temsirolimus, rituximab) remained unaffected, or was even increased (ibrutinib). Experimental therapy of immunodeficient mice confirmed the anticipated loss of anti-tumor activity (as determined by overall survival) of the nucleoside analogs gemcitabine and fludarabine in mice transplanted with R clone compared to mice transplanted with CTRL cells, while the anti-tumor activity of cisplatin, temsirolimus, bortezomib, bendamustine, cyclophosphamide and rituximab remained comparable between the two cohorts.

(Continued on next page)

* Correspondence: pavel.klener@gmail.com

† Equal contributors

¹Institute of Pathological Physiology, Charles University in Prague, First

Faculty of Medicine, Prague, Czech Republic

²First Department of Medicine - Department of Hematology, General

University Hospital and Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

Full list of author information is available at the end of the article



© 2014 Klanova et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

(Continued from previous page)

Conclusions: Acquired resistance of MCL cells to araC is associated with downregulation of DCK, enzyme of the nucleotide salvage pathway responsible for the first phosphorylation (=activation) of most nucleoside analogs used in anti-cancer therapy. The data suggest that nucleoside analogs should not be used in the therapy of MCL patients, who relapse after failure of araC-based therapies.

Keywords: Mantle cell lymphoma (MCL), Cytarabine, Drug resistance, Nucleotide salvage pathway, Proteomics, Mass spectrometry

Background

Mantle cell lymphoma (MCL) is an aggressive type of B-cell non-Hodgkin lymphoma (NHL) associated with poor prognosis [1,2]. In recent years several studies brought evidence that implementation of high-dose cytarabine (araC) into induction therapy, e.g. by sequential chemotherapy by R(ituximab)-CHOP and R-DHAP regimens, induced higher response rate and prolonged progression-free survival compared to R-CHOP-only [3-5]. Based on these results, implementation of araC into induction therapy became standard of care for all newly diagnosed younger MCL patients. Despite considerable improvement, however most high-risk MCL patients relapse even after araC-based first-line regimen. Prognosis of relapsed/refractory (RR) MCL is dismal. Currently, there is no second-line standard-of-care for RR-MCL [6]. Available treatment approaches for RR-MCL include cisplatin, fludauridine, cladribine, gemcitabine, temsirolimus, bortezomib, bendamustine, lenalidomide and ibutinib-based regimen [7-16].

AraC belongs among the backbone anti-leukemia agents [17]. Both, "standard dose" araC (100-200 mg/m² continuous i.v. infusion for 7 days), and "high dose" araC (HDAC, 2-3 g/m², 2-4 i.v. three hour administrations every 12-24 hours) have been widely used in the therapy of acute myelogenous leukemia (AML), as well as in salvage regimen for relapsed B-NHL [18,19]. As mentioned above araC appears particularly effective component of multi-agent aggressive immunochemotherapy regimen used in younger MCL patients.

AraC is a prodrug, which must be 1. transported into the cell, and 2. within the cell converted into an active drug by phosphorylation by specific phosphokinases of the nucleotide salvage pathway [20]. During "standard dose" cytarabine administration araC is transported into the cell by means of specific transporters, primarily via hENT1/SLC29A1 [21]. During high-dose cytarabine administration araC also diffuses across plasma membrane independent of the specific transporters [22]. The rate-limiting enzyme of the nucleotide salvage pathway is deoxycytidine-kinase (DCK), which catalyzes the first phosphorylation of araC into araCMP. AraCMP is retained in the cell and undergoes two additional consecutive phosphorylations before it can be incorporated into DNA.

The molecular mechanisms of araC resistance in MCL are unknown. Resistance to araC in myeloid leukemia cells was repeatedly associated with altered expression of genes involved in nucleotide salvage pathway, including downregulation of DCK, or upregulation of key araC-inactivating enzymes, namely cytidine-deaminase (CDA) or cytoplasmic 5' nucleotidase (NT5C2) [20-25].

In this study we derived araC-resistant MCL cells, studied their sensitivity to a battery of anti-cancer drugs and elucidated the molecular mechanism responsible for araC resistance in MCL.

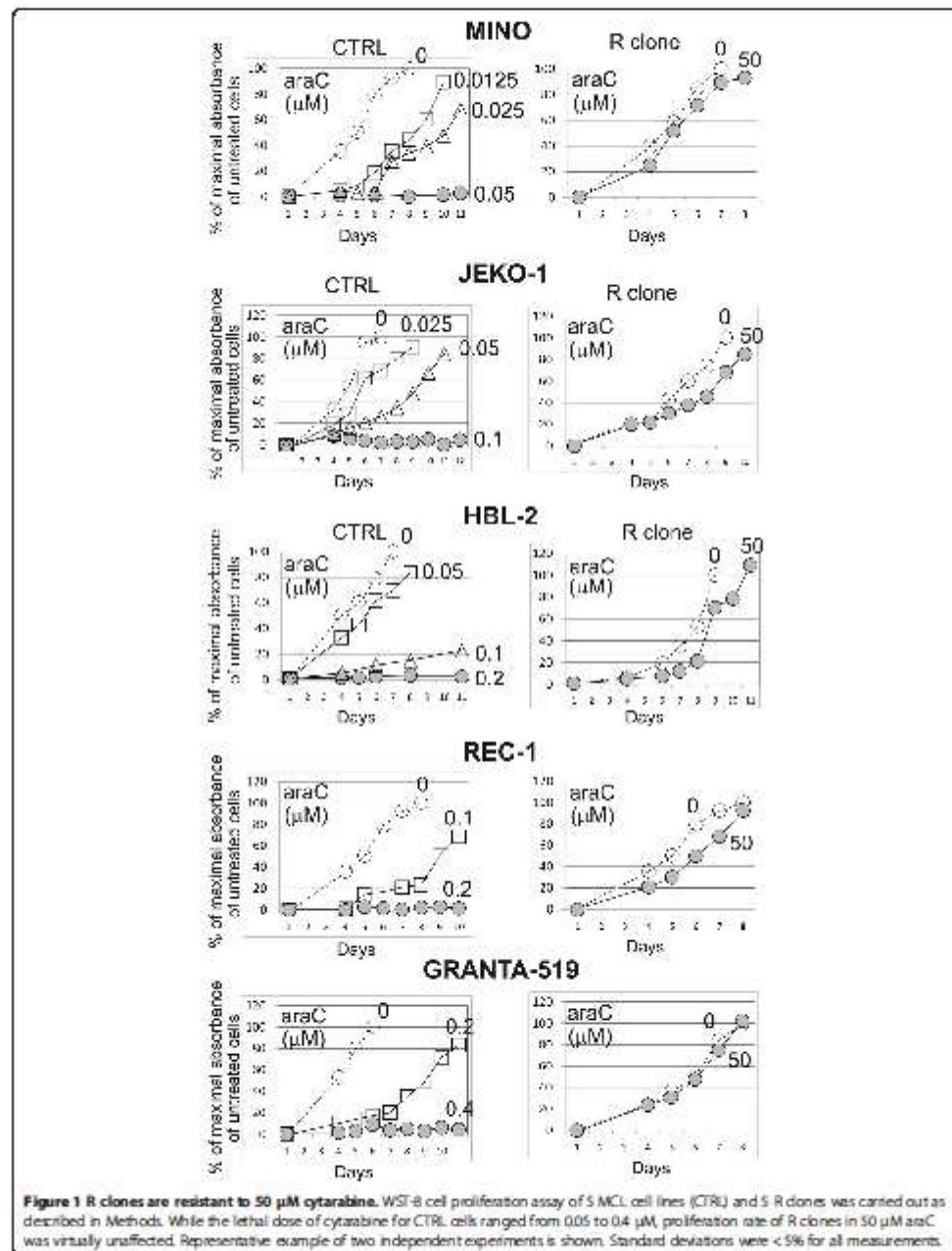
Results

Establishment and characterization of araC-resistant MCL clones (R clones)

Five araC-resistant MCL clones (=R clones) were established by long-term culture of five cytarabine-sensitive MCL cell lines (JEKO-1, MINO, REC-1, HBL-2 and GRANTA-519, =CTRL cell lines) in the presence of increasing doses of araC (up to 50 μ M, comparable with plasma concentration reached in patients treated with high-dose araC) [26]. Resistance of R clones to araC was confirmed *in vitro* by proliferation assays (Figure 1). The R clones tolerated at least 125-1000-fold higher concentrations of araC compared to CTRL cells (Figure 1).

Gene expression profiling of R clones revealed downregulation of deoxycytidine-kinase (DCK)

To identify gene and protein expression changes associated with araC resistance in MCL we performed parallel transcriptome profiling and proteomic analysis of R clones compared to CTRL cell lines. Transcriptomic analysis was performed for each of the 5 MCL cell lines and their respective R clones in biological duplicates using Illumina BeadChips. The filtered groups of genes with fold change at least ± 1.5 -fold and adjusted p value < 0.05 were annotated and arranged into biologically relevant categories using The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID, Additional file 1: Figure S1). Based on Gene Ontology (GO) terms, the downregulated genes were involved in *ribosome structure and function, cell cycle, RNA degradation, antigen processing and presentation, purine metabolism* and *pyrimidine metabolism*



(Additional file 1: Figure S1A). Among the most upregulated gene groups belonged those involved in *graft-vs-host disease*, *allograft rejection*, *B-cell receptor signaling*, *cell adhesion molecules*, *chemokine signaling pathway* and *Toll-like receptor signaling* (Additional file 1: Figure S1B). The only gene consistently differentially expressed across all 5 MCL cell lines was DCK, which was markedly downregulated in all R clones. Other genes differentially expressed in more than one MCL cell line are shown in Additional file 2: Table S1. Proteomic analysis using 2-DE was applied to Mino R subclone compared to Mino CTRL cell line, and revealed differential expression of several proteins, among them almost 5-fold downregulation of DCK in the Mino R subclone was the most apparent (Figure 2, Tables 1 and 2). Downregulation of DCK protein (the rate-limiting enzyme of the nucleotide salvage pathway, which catalyzes the first phosphorylation of a dC and other nucleosides into their respective monophosphates) was confirmed by western blotting in all five R clones (Figure 3). DCK expression seemed to be fully abrogated in four R clones (as there was no detectable DCK) and several-fold downregulated in one R clone compared to the CTRL cells.

AraC-resistant clones are cross-resistant to nucleoside analogs, but remain sensitive to other classes of anti-lymphoma agents

To identify optimal treatment strategy for araC-resistant MCL we determined sensitivity (or eventual cross-resistance) of all 5 R clones in a battery of cellular toxicity tests. We exposed R clones and CTRL cells to a panel of clinically used anti-MCL agents in various concentrations and measured their effect on cell proliferation rate. The tested agents included both, classical genotoxic cytostatics and novel targeted drugs. The panel included alkylating agents cisplatin, doxorubicin and bendamustine, nucleoside analogs gemcitabine, cladribine and fludarabine, and targeted drugs bortezomib (proteasome inhibitor), temsirolimus (mTOR inhibitor) and ibrutinib (BTK inhibitor). All five R clones (resistant to a pyrimidine analog cytarabine) showed cross-resistance not only to another pyrimidine analog gemcitabine (up to 3125-fold), but also to purine nucleoside analogs fludarabine and cladribine (approx. 12.5-500-fold, see Figure 4A,B). Sensitivity of the resistant R clones to other classes of anti-lymphoma agents (i.e. other than nucleoside analogs) remained comparable to the respective CTRL cells (Figure 4C,D), with the exception of ibrutinib. The BTK inhibitor ibrutinib proved to be significantly more cytotoxic to R clones compared to CTRL cells *in vitro* (see Figure 4C,D, Additional file 3: Figure S2). R clones also retained *in vitro* sensitivity to anti-CD20 monoclonal antibody rituximab comparable to CTRL cells as determined by ^{51}Cr release assay, which is standardly used to evaluate

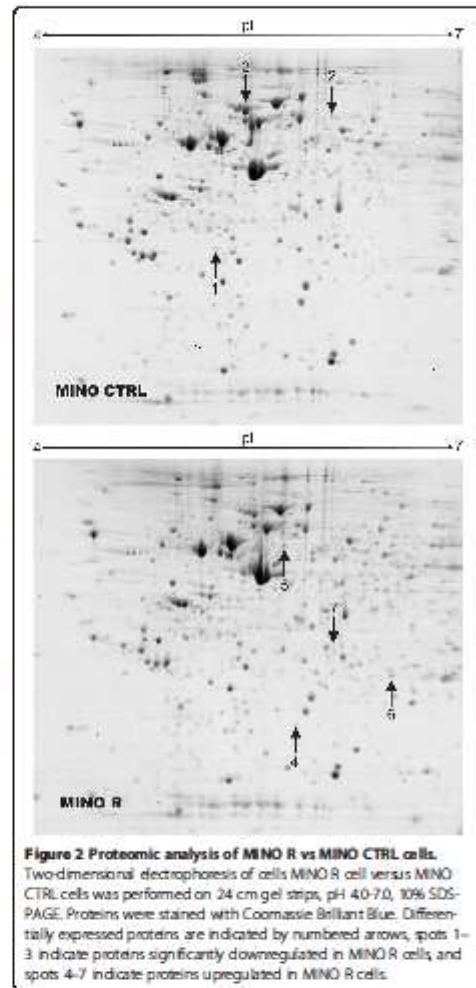


Figure 2 Proteomic analysis of MINO R vs MINO CTRL cells. Two-dimensional electrophoresis of cells MINO R cell versus MINO CTRL cells was performed on 24 cm gel strips, pH 4.0-7.0, 10% SDS-PAGE. Proteins were stained with Coomassie Brilliant Blue. Differentially expressed proteins are indicated by numbered arrows, spots 1-3 indicate proteins significantly downregulated in MINO R cells and spots 4-7 indicate proteins upregulated in MINO R cells.

antibody-dependent cytotoxicity (ADCC) and complement-mediated cytotoxicity (CMC) of therapeutic monoclonal antibodies (Figure 5).

Experimental therapy with fludarabine and gemcitabine is ineffective in mice xenografted with araC-resistant clones

The *in vitro* tests of cellular toxicity provided important information on direct cellular effects of the tested drugs to the resistant cells. However, *in vitro* assays do not take into account important systemic pharmacokinetic

Table 1 List of proteins differentially expressed in MINO R cells identified by 2-DE

Spot no.	Accession	Protein name	Fold change	Mascot score	Sequence cov. (%)	Mr
Proteins downregulated in MINO R cells						
1	P27707	Deoxycytidine kinase	-4.6	44*	16	30841
2	Q99829	Copine-1	-4.3	102	17	59649
3	P13796	Plastin-2	-2	463	65	70814
Proteins upregulated in MINO R cells						
4	P07741	Adenine phosphoribosyltransferase	5	70	40	19766
5	P68363	Tubulin alpha-1B chain	5	169	32	50804
6	P04792	Heat shock protein beta-1	2/3	73	32	22826
7	P31937	3-Hydroxyisobutyrate Dehydrogenase, Mitochondrial	2/1	43*	8	35712

*Identity of proteins with low Mascot Score was verified by MS/MS (see Table 2). Included are the proteins with difference in expression at least 2-fold and statistical significance of the change $p < 0.05$. Swiss Prot. no. is the code under which the identified protein is deposited in the SwissProt database. Mascot score helps to estimate the correctness of the individual hit. It is expressed as $-10 \times \log(P)$ where P is the probability that the observed match is a random event. Sequence coverage is the number of amino acids spanned by the assigned peptides divided by the sequence length.

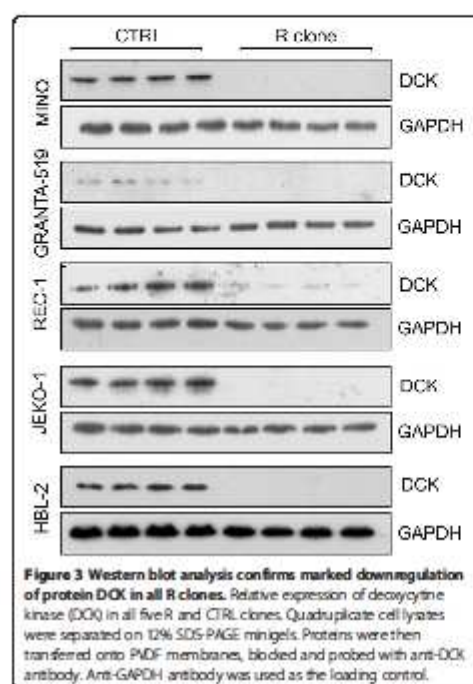
and pharmacodynamic variables, which can have large impact on the drug efficacy *in vivo*. In addition, some anti-MCL agents cannot be properly tested *in vitro*, because their mechanism of antitumor activity directly or indirectly depends on the *in vivo* context, e.g. activation of a prodrug cyclophosphamide in the liver microsomes, cooperation of a monoclonal antibody rituximab with complement and cells of the immune system, or antiangiogenic component of temsirolimus activity. Therefore, we used a mouse xenograft model (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/Sz) mice of MCL to simulate *in vivo* treatment of araC-sensitive and araC-resistant disease. Intravenous injection of 1 million JEKO-1 MCL cells leads to demise of the xenografted animals due to disseminated lymphoma with median overall survival of approx. 38 days. Experimental therapy of JEKO-1-xenografted immunodeficient mice with single-agent fludarabine and gemcitabine confirmed total loss of anti-tumor activity of purine analog fludarabine and pyrimidine analog gemcitabine (measured as overall survival of experimental animals) in mice transplanted with cytarabine-resistant JEKO-1 R clone compared to mice transplanted with cytarabine-sensitive JEKO-1 CTRL cells (Figure 6). Anti-tumor activity of cisplatin, temsirolimus, bendamustine, bortezomib, cyclophosphamide and rituximab remained comparable between JEKO-1 R clone and JEKO-1 CTRL-xenografted mice in agreement with the *in vitro* tests (Figure 6).

Analysis of primary MCL samples confirmed that downregulation of DCK is frequently associated with failure of high-dose araC-based treatments

Eight and two primary MCL samples obtained from patients at diagnosis (D1-D8) and at lymphoma relapse after failure of high-dose araC-based treatments (R1-R8) were analyzed by real-time RT-PCR and western blotting, respectively (Table 3, Figure 7A). In four cases downregulation of DCK gene expression was observed in R compared to D samples (difference in $\Delta\Delta CT$ (DCK-GAPDH) between R and D samples was > 1 cycle), while in four cases no change was observed (difference in $\Delta\Delta CT < 1$ cycle) (Table 3). Western blotting analysis of the sample R2 compared to D2 revealed marked downregulation of protein DCK thereby confirming the gene expression results (i.e. 4-fold decrease in total DCK mRNA after araC-based therapy). Interestingly, protein DCK in the sample R6 compared to D6 was also moderately downregulated despite its gene expression remained virtually unchanged (Figure 7A, Table 3). In addition to the analysis of MCL samples obtained from the relapsed patients, paired primary cells isolated from two MCL patients (samples D9/R9, and D10/R10) refractory to araC were subject to analysis of gene and protein expression, and determination of their *ex vivo* sensitivity to nucleoside analogs (Figure 7B,C). The samples were obtained before araC administration (D9, D10), and 14 days after araC administration (R9, R10). Downregulation of both gene

Table 2 Identity of differentially expressed proteins with low mascot score confirmed by MS/MS

Spot no.	Accession	Protein name	Peptide sequence	Score
1	P27707	Deoxycytidine kinase	LKDAEKPLFFER, QLCEDEWPEPVAR	41, 46
7	P31937	3-Hydroxyisobutyrate Dehydrogenase, Mitochondrial	DFSSVRQLREETF (C-term), SPILLGSLAHQNR	49, 28



and protein DCK expression was confirmed in R9 compared to D9 cells (Figure 7B). Sensitivity of R9 cells to araC, fludarabine and gemcitabine was significantly suppressed compared to D9 cells (Figure 7C). Both gene expression and protein expression of R10 compared to D10 sample remained unchanged (Figure 7B). Interestingly, susceptibility of R10 cells compared to D10 cells to undergo apoptosis after their *ex vivo* exposure to araC was increased despite the fact that R10 cells were isolated after administration of four cycles of high-dose araC (Figure 7C).

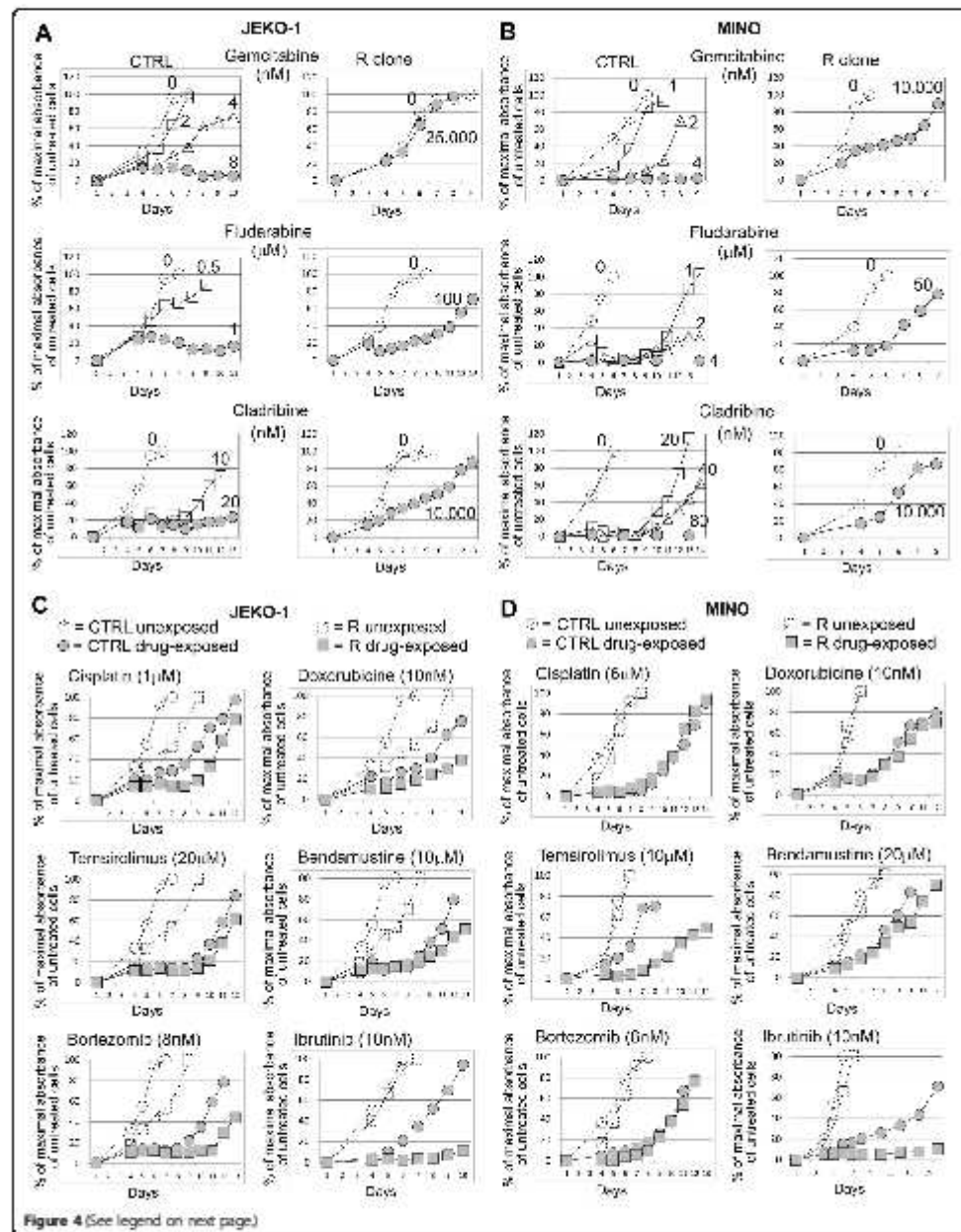
Discussion

In this study we analyzed molecular mechanisms of araC resistance in five MCL cell lines and ten paired primary MCL samples obtained before and after araC-based therapies. In addition, we tested optimal treatment strategies for cytarabine-resistant MCL. On molecular level we identified marked and principal downregulation of DCK, the rate-limiting enzyme of nucleotide salvage pathway, in all 5 cytarabine-resistant MCL clones, and in 50% primary MCL samples obtained from patients, who progressed on or relapsed after araC-based treatments. In 50% primary MCL samples, no change of DCK expression was observed at time of lymphoma relapse or progression.

Importantly, no upregulation of DCK was observed in any of the analyzed post-treatment samples. Although the analysis of the primary MCL samples indicate that the mechanisms responsible for araC resistance *in vivo* are more complex than those observed *in vitro*, it must be emphasized that downregulation of gene and protein DCK was indeed confirmed in a substantial part of the patients' post-treatment samples (Table 3, Figure 7A,B). Interestingly, in one of the two MCL patients primary resistant to araC, no change of DCK expression was observed with slightly increased *ex vivo* sensitivity of post-treatment MCL cells to araC (Figure 7B,C). This observation could be explained by existence of araC-resistant stem cell-like MCL cells that would reside in the niches in lymph nodes (and/or bone marrow) and produce partially araC-sensitive MCL cells mobilized in the peripheral blood. In such a case, elimination of the mobilized MCL cells, but persistence of the stem cell-like MCL compartment, would lead to stable disease, and eventual lymphoma progression (which was the actual course of the disease observed in this patient).

DCK catalyzes the first phosphorylation (=activation necessary for their cytotoxic activity) not only of araC into araCMP, but also of most nucleoside analogs (both pyrimidine and purine-derived) commonly used in anti-cancer therapy. Using DAVID bioinformatic analyzer *purine/pyrimidine metabolism*, and *B-cell receptor signaling* were among the functional categories associated with the most downregulated and upregulated genes, respectively. In accordance with these results we subsequently showed that all R clones were cross-resistant to both pyrimidine analog gemcitabine, and to purine analogs fludarabine and cladribine (all of which are activated by DCK). Sensitivity of R clones to other types of anti-cancer molecules including genotoxic cytostatics (cisplatin, doxorubicin, bendamustine), targeted drugs (temsirolimus, bortezomib) or biological agents (monoclonal anti-CD20 antibody rituximab) remained unaffected, or was even augmented in the case of BTK inhibitor ibrutinib. The reason, why ibrutinib more effectively eliminated araC-resistant MCL cells remained elusive, but might be at least partially explained by the observed upregulation of B-cell receptor signaling in R clones compared to CTRL cells (Additional file 1: Figure S1).

The results of our *in vitro* and *in vivo* tests combined with the observed decreased expression of DCK in all araC-resistant MCL clones and in 50% post-treatment primary MCL samples suggest that the resistance of MCL cells to high-dose araC is caused by suppressed araC activation by DCK due to markedly decreased DCK expression. DCK has low substrate preference and phosphorylates both, purines and pyrimidines, including synthetic analogs cytarabine, fludarabine, gemcitabine and cladribine [27-29]. The fact that above-mentioned nucleoside analogs are

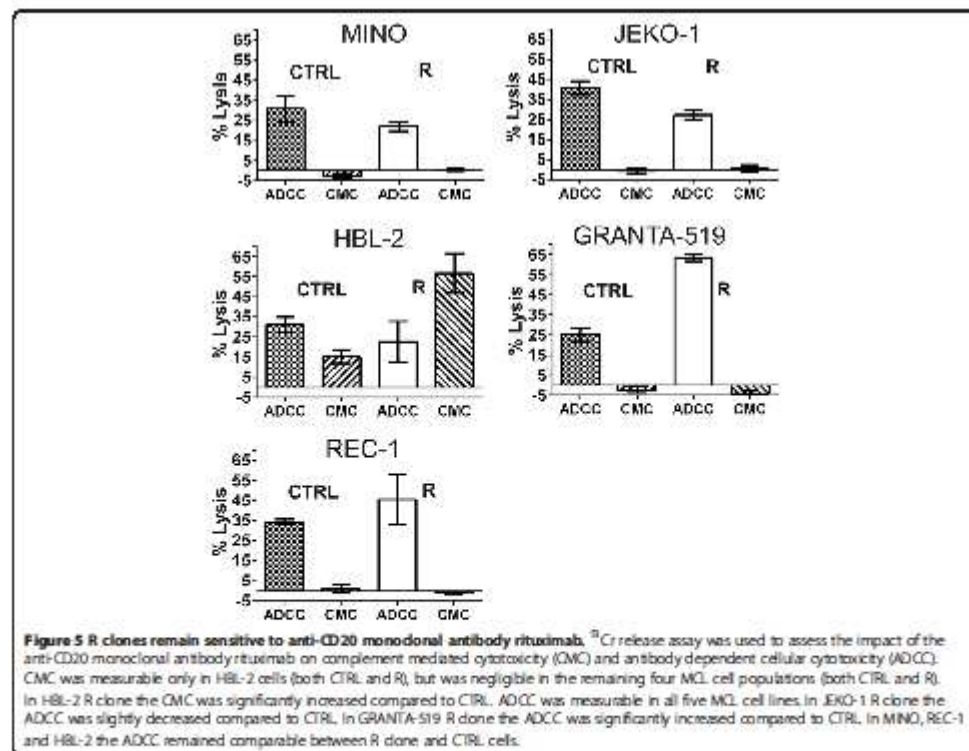


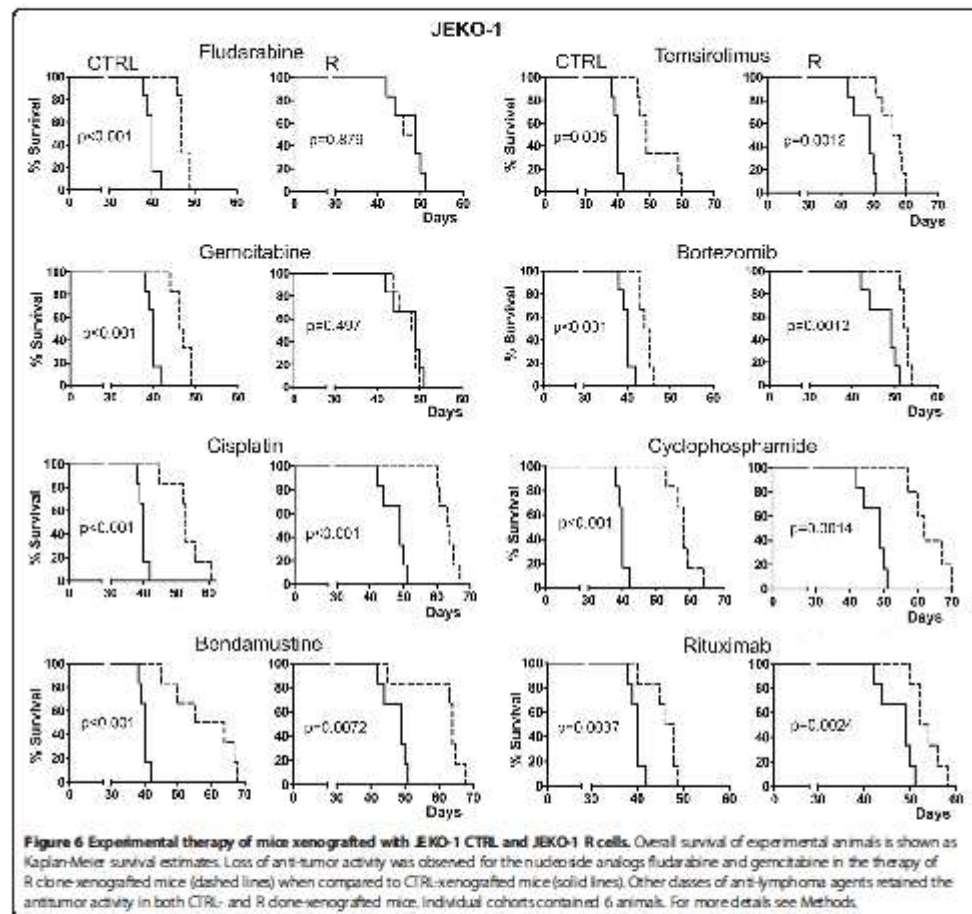
(See figure on previous page.)

Figure 4 R clones are cross-resistant to nucleoside analogs, but remain sensitive to other classes of anti-lymphoma agents. (A-D) WST-8 cell proliferation assays of CTRL. cells and R clones were carried out as described in Methods. Maximal absorbance obtained from the untreated cells during the particular experiment (MAX₀) was arbitrary set as 100%. Absorbance of medium without cells was used as background (B). For each cell population (both, unexposed and drug-exposed) and for each measurement (M₁, M₂, M₃...M_n) the proliferation curve was calculated as follows: $(M_n - B)/(MAX_0 - B)$. As a consequence, proliferation curves of untreated cells always peak at 100%, while proliferation curves of drug-exposed cells can terminate below or above 100%. One representative example of two independent experiments carried out both on JEKO-1 (A, C) and MINO (B, D) is shown. Data from the remaining three MCL cell lines (HBL-2, GRANTA-519 and REC-1) are not shown, because they did not significantly differ from those presented for the JEKO-1 and MINO cells. In summary, all 5 R clones were cross-resistant to the tested nucleoside analogs, but remained sensitive to other classes of anti-lymphoma agents with negligible differences between particular MCL cell lines. The only exception to the rule was markedly (>100-fold) increased sensitivity of REC-1 R clone to ibrutinib compared to REC-1 CTRL. cells (see Additional file 3; Figure S2). The remaining 4 MCL cell lines (JEKO-1, MINO, GRANTA-519 and HBL-2) showed only approx 2-fold increased sensitivity to ibrutinib compared to the corresponding CTRL. cells. Standard deviations were < 5% for all measurements presented in Figure 4.

substrates of DCK explains the observed cross-resistance of R clones to all tested nucleoside analogs, both purine- and pyrimidine-derived. Retained sensitivity to other classes of anti-MCL agents (i.e. other than nucleoside analogs) with diverse molecular mechanisms of their respective antitumor activities suggests that no major additional molecular alteration was involved in the development of a nC resistance.

Prognosis of patients with relapsed/refractory MCL (RR-MCL) is dismal. Currently there is no standard-of-care for RR-MCL patients. Second-line treatment approaches include fludabine, gemcitabine, cladribine, cisplatin, bortezomib, temsirolimus, bendamustine, lenalidomide and ibrutinib-based regimen. We have proved *in vitro* and *in vivo* on a mouse xenograft model of MCL that treatment of patients, who progress on or relapse





after high-dose araC-based regimen should not rely on nucleoside analogs, namely on the currently used agents fludarabine, gemcitabine and cladribine, since all of them must be phosphorylated by DCK to exert their anti-lymphoma activity. Instead, other classes of anti-lymphoma drugs should be applied in case of araC failure, i.e. in the setting of anticipated araC-resistance. Some of these agents have only recently been approved for the therapy of relapsed/refractory (RR-) MCL, temsirolimus in Europe, bortezomib and ibrutinib in USA. It might be speculated that high-dose therapy (given before autologous stem cell transplant) based on other agents than nucleoside analogs might prove more beneficial especially for those patients with suboptimal responses after induction araC-based immunochemotherapy (e.g. patients, who achieve partial

remission, or patients with detectable minimal residual disease). In addition to the currently approved agents, bendamustine represents another extremely promising drug in MCL. Recently it was demonstrated that bendamustine potentiates the effect of araC by augmenting the level of intracellular ara-CTP, and the R-BAC (rituximab, bendamustine, araC) regimen was shown to be effective even in patients resistant to araC thus providing a treatment option even for the elderly and/or frail patients [16,30,31]. It might be speculated that the increased level of ara-CTP might partially offset the anticipated downregulation of DCK thereby explaining, why the combination of bendamustine and araC was shown to be effective even in patients, who relapsed after araC-based therapies [30].

Table 3 Gene expression analysis of DCK in a set of primary MCL samples obtained from patients before and after araC-based therapies

Sample at diagnosis	Source	Δ CT (DCK-GAPDH)	Therapy	Sample at relapse	Disease-free survival (months)	Source	Δ CT (DCK-GAPDH)	Difference in Δ CT between R and D samples
D1	PBMC	3.4	A*	R1	12	PBMC	3.7	+0.3
D2	PE**	3.3	A	R2	10	PE**	5.3	+2.0
D3	FFPE	0.1	A	R3	5	FFPE	1.3	+1.2
D4	FFPE	1.7	B	R4	4	FFPE	3.5	+1.8
D5	PBMC	1.4	A	R5	7	PBMC	2.2	+0.8
D6	PBMC	4.1	B**	R6	3	PBMC	3.9	-0.2
D7	FFPE	1.3	B	R7	13	FFPE	3.5	+2.2
D8	FFPE	2.0	A	R8	25	FFPE	1.8	-0.2
D9	PBMC	1.9	B	R9	N/A	PBMC	3.3	+1.4
D10	PBMC	2.3	A	R10	N/A	PBMC	1.5	-0.8

*A – alternation of R-CHOP and R-araC (2 g/m², 2 doses a 24 h).

**B – Nordic protocol (alternation of R-MaxiCHOP and R-araC (2-3 g/m², 4 doses a 12 h).

***PE plasma effusion (CD19-sorted).

Samples from relapsed patients were obtained at diagnosis (D1-D8) and at lymphoma relapse after failure of araC-based therapies (R1-R8). Samples from refractory patients were obtained from primary araC-resistant MCL patients before (D9-D10) and 14 days after (R9-R10) administration of high-dose araC. Real-time RT-PCR was used to determine changes in DCK expression.

Conclusions

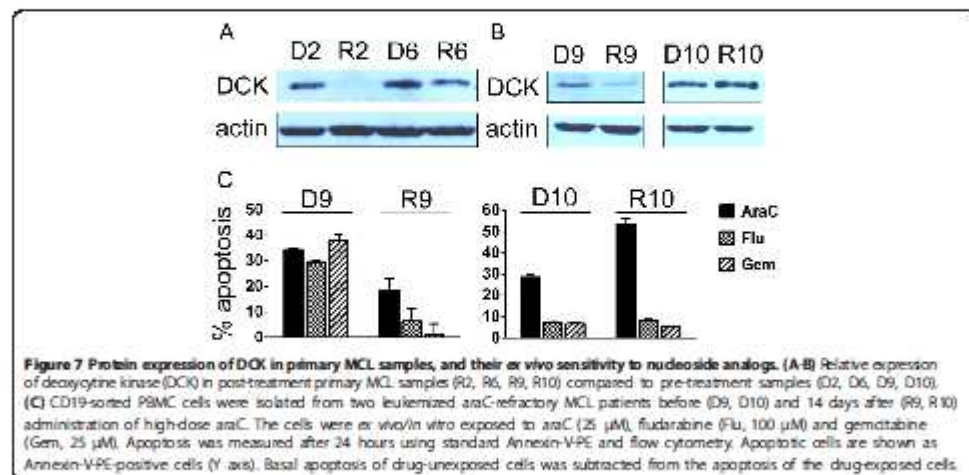
Our data from the cell lines and primary MCL samples clearly demonstrate that acquired resistance of MCL cells to araC is associated with downregulation of mRNA and protein expression of DCK, enzyme of the nucleotide salvage pathway responsible for phosphorylation of most nucleoside analogs used in anti-cancer therapy. In translation, the results suggest that 1. nucleoside analogs should not be used for the second-line therapy of MCL patients, who fail after araC-based regimen; 2. non-nucleoside analogs should be employed in this setting,

including cisplatin, ibrutinib, temsirolimus, bortezomib or bendamustine; 3. ibrutinib appears particularly effective in eliminating araC-resistant MCL cells.

Methods

Cell culture

JEKO-1, GRANTA-519 and REC-1 were purchased from German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ), MINO was from American Tissue Culture Collection (ATCC), HBL-2 was a kind gift of prof. Dreyling (University of Munich, Germany). Cell lines were cultured



in Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) supplemented with 15% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin.

Reagents

Cytarabine, fludarabine, gemcitabine, cladribine, cyclophosphamide, doxorubicin and cisplatin were from Clinical Dept. of Hematology, University Hospital in Prague, Czech Republic. Temsirolimus, bortezomib, bendamustine and ibrutinib were purchased from Selleck Chemicals. Rituximab was kindly provided by Roche, Czech Republic.

Establishment of *araC*-resistant clones

MCL cell lines were incubated in Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) supplemented with 15% fetal bovine serum with increasing concentrations of cytarabine up to 50 μ M.

Proliferation assays

Proliferation was estimated using WST-8 Quick Cell Proliferation Assay Kit (BioVision) according to the manufacturer instructions. Briefly, 5000 cells were seeded into 96-well plate on day 1. Drugs were added on day 1. Proliferation was measured on day 1 and then since day 4 daily. Antiproliferative activity of each drug was analyzed at several concentrations.

Absorbance of the triplicate samples was measured on ELISA reader after 3 hour incubation with WST-8 reagent at 37 grades Celsius in the thermostat. Maximal absorbance (MAX_{96}) obtained from the untreated cells during the particular experiment was arbitrary set as background (B). For each cell population (both, unexposed and drug-exposed) and for each measurement ($M_1, M_2, M_3, \dots, M_X$) the proliferation curve was calculated as follows: $(M_X - B)/(MAX_{96} - B)$. As a consequence, the proliferation curve of untreated cells always peaks 100%, while proliferation curves of drug-exposed cells can terminate below or above 100%.

^{51}Cr release assay for the assessment of the impact that CD20 mAbs have on rituximab-mediated complement mediated cytotoxicity (CMC) and antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC)

CTRL MCL cells and R clones were labeled with ^{51}Cr at 37°C, 5% CO₂ for 2 hrs. ^{51}Cr -labeled cells were then placed in 96-well plates at a cell concentration of 1×10^5 cells/well (complement-mediated cytotoxicity (CMC) assay) or 1×10^4 cells/well (antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC) assay). Cells were then exposed to rituximab (10 mg/ml) or isotype antibody (10 mg/ml) and human serum (for CMC assay, 1:4 dilution) or peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) (for ADCC assay, 40:1 effector:target ratio) for six hrs at 37°C and 5% CO₂. ^{51}Cr release was measured

from the supernatant by standard gamma counting and the percentage of lysis was calculated. PBMCs were obtained from healthy donors (Roswell Park Cancer Institute IRB-approved protocol CIC-016) and isolated by Histopaque-1077 ultracentrifugation of peripheral whole blood and used as an effector: target ratio of 40:1 for ADCC assays. Pooled human serum was used as the source of complement for CMC assays.

Gene expression profiling and data analysis

A biological duplicate of each *araC*-resistant MCL clone (R) was compared to a biological duplicate of the original *araC*-sensitive (CTRL) cell line. In total, five R clones were compared to five corresponding CTRL cell lines using two microarray chips. Total RNA was extracted by RNeasy Mini Kit (Qiagen), and its quality verified using the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technology). Extracted RNA was amplified using the Illumina RNA Amplification Kit (Ambion). Amplified RNA was hybridized to the Illumina HumanRef-8 and HumanRef-12 BeadChips (Illumina). Subsequent data analysis was performed in R-software, mainly in limma package from Bioconductor (<http://www.bioconductor.org>). Multiple testing correction was performed using Benjamini & Hochberg method. The filtered group of genes with fold change at least ± 1.5 -fold and adjusted p value < 0.05 were annotated and arranged into biologically relevant categories using The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID, <http://david.abcc.ncifcrf.gov>).

Primary MCL sample acquisition, real-time RT-PCR analysis, and apoptosis measurement

All primary MCL samples were obtained from patients with MCL at diagnosis (D1-D10), and at the relapse or during progression after failure of high-dose *araC*-based front-line therapies (R1-R10). Samples were obtained from patients, who signed informed consent according to the Declaration of Helsinki. Mononuclear cells were isolated from all PBMC and PE samples by the standard Ficoll-Hypaque gradient centrifugation. Mononuclear cells were then CD19 sorted on magnetic columns using CD19 microbeads (Miltenyi Biotec). The purity of MCL population after sorting was > 95% in all cases as verified by flow-cytometry. Total RNA was isolated from CD19-sorted PBMC or PE cells stored in RNeasy lysis solution using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and from fresh-frozen paraffin-embedded (FFPE) lymph node samples using High Pure RNA Paraffin Kit (Roche Diagnostics GmbH, Germany) according to the manufacturer's instructions. cDNA synthesis was carried out from 1 μ g of total RNA with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (random primers) (Applied Biosystems). Real-time RT-PCR was performed using TaqMan Gene Expression Assays on the ABI 7900HT detection system (Applied

Biosystems). The reference gene was GAPDH. *Ex vivo* apoptosis of primary MCL cells was determined using Annexin-V-PE (Apronex, Czech Republic) and flow cytometry (BD FACS Canto II) according to the manufacturer's instructions after 24 hours exposure to 25 μ M araC, 100 μ M fludarabine and 25 μ M gemcitabine.

Experimental therapy of MCL xenografts

In vivo studies were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee. Immunodeficient NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{em1WJ}/SzJ mice (Jackson Laboratory) were maintained in individually ventilated cages. JEKO-1 cell line-based mouse model of MCL was used for experiments [32]. JEKO-1 cells were harvested, suspended in PBS, and injected (1×10^6 /mouse) iv. into tail vein of 8- to 12-week-old female mice on DAY 1. Therapy was initiated on DAY 8. Each cohort of mice contained 6–8 animals. The mice received treatment as follows: temsirolimus 1 mg s.c. 1 x weekly (3 cycles), cyclophosphamide 3 mg i.p. 1 x weekly (3 cycles), bendamustine 0.5 mg i.p. two subsequent days (day 1 + day 2) every two weeks (2 cycles), bortezomib 25 μ g i.p. 2 x weekly (3 cycles), cisplatin 180 μ g i.p. every two weeks (2 cycles), gemcitabine 10 mg i.p. 1 x weekly (3 cycles), fludarabine 1 mg three subsequent days (day 1–3) weekly (3 cycles), rituximab 250 μ g s.c. 1 x weekly (3 cycles). The data were analysed in GraphPad Software.

Two-dimensional electrophoresis

IPG strips (pH 4.0–7.0, 24 cm; ReadyStrip, Bio-Rad) were rehydrated overnight in 450 μ L of sample, representing 1.5 mg of protein. Isoelectric focusing was performed for 70 kVh using Protean IEF cell (Bio-Rad). Six replicates were run for each cell type. Focused strips were equilibrated and reduced in equilibration (6 M urea, 50 mM Tris pH 8.8, 30% glycerol, 2% SDS) supplemented with DTT (450 mg per 50 mL) for 15 min and then alkylated in equilibration buffer with added iodoacetamide (1.125 mg iodoacetamide per 50 mL). SDS-PAGE electrophoresis was performed in a Tris-glycine-SDS system using a 12-gel Protean Dodeca Cell apparatus (Bio-Rad) with buffer circulation and external cooling (20°C). Gels were run at a constant voltage of 80 V per gel for 30 min and then at a constant voltage of 200 V for 6 h. Gels were washed in deionized water to remove redundant SDS and with colloidal Coomassie Brilliant Blue (SimplyBlue™ Safestain, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) overnight.

Gel image analysis and extraction of peptides

Stained gels were scanned with GS 800 calibrated densitometer (Bio-Rad) and image analysis was performed with Progenesis™ software (Nonlinear Dynamics, Ltd., Newcastle upon Tyne, UK) in semi-manual mode with 6 gel replicates for each cell type. Normalization of gel images was based

on total spot density, and integrated spot density values (spot volumes) were then calculated after background subtraction. Average spot volume values (averages from the all 6 gels in the group) for each spot were compared between the groups. Protein spots were considered differentially expressed if their average normalized spot volume difference was > 2-fold. As determined by the Student's t-test, a p-value < 0.05 was considered to indicate a statistically significant difference.

Protein digestion and peptide extraction

Spots containing differentially expressed proteins were excised from the gels, cut into small pieces and washed 3 times with 25 mM ammonium bicarbonate in 50% acetonitrile (ACN). The gels were then dried in a Speed-Vac Concentrator (Eppendorf, Hamburg, Germany). Sequencing grade modified trypsin (Promega, Madison, WI, USA) (6 ng/ μ L in 25 mM ammonium bicarbonate in 5% ACN) was added. Following overnight incubation at 37°C, the resulting peptides were extracted with 50% ACN.

MS analysis and protein identification

Peptide samples were spotted on a steel target plate (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) and allowed to dry at room temperature. Matrix solution (3 mg α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 1 ml of 50% ACN containing 0.1% trifluoroacetic acid) was then added. MS was performed on an Autoflex II MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) using a solid nitrogen laser (337 nm) and FlexControl software in reflectron mode with positive ion mass spectra detection. The mass spectrometer was externally calibrated with Peptide Calibration Standard II (Bruker Daltonics). Spectra were acquired in the mass range 800–3000 Da. The peak lists were generated using FlexAnalysis and searched against Swiss-Prot (2012_07 version, 536 789 sequences) using Mascot software. The peptide mass tolerance was set to 100 ppm, taxonomy Homo sapiens, missed cleavage was set to 1, fixed modification for cysteine carbamidomethylation, and variable modifications for methionine oxidation and protein N-terminal acetylation. Proteins with Mascot score over the threshold 56 for $p < 0.05$ calculated for the used settings were considered as identified. If the score was lower, the identity of protein candidate was confirmed by MS/MS.

Western blot analysis

Cells were lysed in NHT buffer (140 mM NaCl, 10 mM HEPES, 1.5% Triton X-100, pH 7.4). Protein concentration in the collected supernatants was determined by the Bradford assay (Bio-Rad). Lysate samples (50 μ g) were combined with SDS loading buffer containing 2-mercaptoethanol and boiled for 5 min. Quadruplicate samples were separated on 12% SDS-PAGE minigels in Tris-glycine buffer (Bio-Rad).

Electrophoresis was performed at a constant voltage for 30 min at 45 V per gel, and then at 90 V per gel until the dye front reached the gel bottom. Proteins were transferred onto 0.45 μ m PVDF membranes (Millipore, Billerica, MA, USA) in a semi-dry blotter (Hoefer, San Francisco, CA, USA) at 0.8 mA/cm². Membranes were incubated in PBS (Invitrogen) containing 0.1% Tween-20 and 5% non-fat dried milk for 1 h. GAPDH or Actin were used as the loading controls. As primary antibodies anti-deoxycytidine kinase mouse monoclonal antibody (sc 81245 Santa Cruz Biotechnology, Sanat Cruz, CA, USA) diluted 1:200 or polyclonal anti-GAPDH produced in rabbit (Sigma-Aldrich, G9545) diluted 1:10,000 were used. After thorough washing in blocking buffer, a secondary horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse (sc2005) or anti-rabbit antibody (sc2313) (both from Santa Cruz Biotechnology) was added (1:10,000). The signal was detected using LumiGLO Reserve, (KPL, Gaithersburg, MD, USA) or Western Blotting Luminol Reagent (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) and membranes were exposed to X-ray films (Kodak, Rochester NY, USA).

Additional files

Additional file 1: Figure S1. Functional categories of genes differentially expressed in R compared to CTRL, as determined by DAVID. The filtered group of genes acquired from all five MCL cell lines with fold change at least ± 1.5 -fold and adjusted p value < 0.05 were annotated and arranged into biologically relevant categories using The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID), <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>.

Additional file 2: Table S1. List of genes differentially expressed in more than one R clone compared to the corresponding CTRL cells. Microarray data are shown in Additional file 2, Table S1. 31 genes were differentially expressed in two araC-resistant clones (R) compared to the corresponding araC-sensitive controls (CTRL). 1 gene (TPM1) was differentially expressed in three R clones, and 1 gene (DCK) was differentially expressed in all five R clones compared to the corresponding CTRL.

Additional file 3: Figure S2. Ibrutinib appears more cytotoxic to cytarabine-resistant (R) compared to cytarabine-sensitive (CTRL) MCL cells. WST-8 cell proliferation assays of CTRL cells and R clones were carried out as described in Methods. Maximal absorbance obtained from the untreated cells during the particular experiment (MAX) was arbitrary set as 100%. Absorbance of medium without cells was used as background (B). For each cell population (both, unexposed and drug-exposed) and for each measurement ($M_1, M_2, M_3, \dots, M_n$) the proliferation curve was calculated as follows: $(M_n - B)/(MAX_n - B)$. As a consequence, proliferation curves of untreated cells always peak at 100%, while proliferation curves of drug-exposed cells can terminate below or above 100%. One representative example of two independent experiments carried out on REC-1, HBL-2 and GRANTA-519 is shown. In summary, REC-1 R clone was > 100-fold sensitive to Bruton tyrosine-kinase (BTK) inhibitor ibrutinib compared to REC-1 CTRL cells. Both HBL-2 and GRANTA-519 R clones were approx. 2-fold more sensitive to ibrutinib compared to HBL-2 and GRANTA-519 CTRL cells.

Abbreviations

ACN: Acetonitrile; ADCC: Antibody-dependent cytotoxicity; AML: Acute myelogenous leukemia; BTK: Bruton tyrosine-kinase; araC: Cytarabine, a pyrimidine analog used for anticancer therapy; CDA: Cytidine-deaminase, a key inactivating enzyme of nucleotide salvage pathway; CMC: Complement-mediated cytotoxicity; CTRL: araC-sensitive MCL cell line; DCK: Deoxycytidine-kinase, a rate-limiting enzyme of nucleotide salvage pathway.

DTI: Dithiothreitol; FFPE: Fresh-frozen paraffin-embedded (lymph node sections); HDAC: High-dose araC; iv: Intravenous injection; MCL: Mantle cell lymphoma; NHL: Non-Hodgkin lymphoma; NER3:2: Cytoplasmic 5'-nucleotidase II, a key inactivating enzyme of nucleotide salvage pathway; PBMC: Peripheral blood mononuclear cells; PE: Peroral effusion; R araC: resistant clone derived from araC-sensitive cell line; R CHOP: A combination of rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristin and prednisone; R DHAP: A combination of rituximab, high-dose cytarabine, cisplatin and dexamethasone; RRMCL: Relapsed/refractory mantle cell lymphoma; s.c.: subcutaneous injection.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

PK and JP conceived of the study and participated in drafting of the manuscript. MK carried out gene expression analysis and *in vivo* experiments. CV, LL and JP carried out proteomic analysis and western blotting. SM, DV, JM, PV and LL participated in *in vitro* experiments. CM carried out chromosome-releasing assays. VK performed the statistical analysis. FH and MV participated in the design of the study and helped to review the manuscript. RJ and MF carried out analysis of primary MCL samples. All authors read and approved the final manuscript.

Authors' information

Jit Petek and Pavel Kener J are considered senior co-authors.

Acknowledgements

Financial Support: IGA-MZ N132014/2012, GA014-199905, GAUK446211, GAUK 253284/200712, GAUK 995912, GAUK 1270254, UNCE-204021, P10016/27/LF1/L, P10016/P24/LF1/3, SVV-2013-266509 and BOCEV - Biotechnology and Biomedicine Centre of the Academy of Sciences and Charles University in Vestec (CZ.05/1.1/00/02/0/09), from the European Regional Development Fund.

Author details

¹Institute of Pathological Physiology, Charles University in Prague, First Faculty of Medicine, Prague, Czech Republic. ²First Department of Medicine - Department of Hematology, General University Hospital and Charles University in Prague, Prague, Czech Republic. ³Institute of Pathology, General University Hospital and Charles University in Prague, Prague, Czech Republic. ⁴Departments of Immunology and Medicine, Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, NY, USA. ⁵Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic.

Received: 29 January 2014 Accepted: 28 June 2014

Published: 27 June 2014

References

1. Dreyling M, Klein-Nelms HC, Bal S, Klapper W, Vogt N, Delib L, Lauer M-H, Hutter G, Cheah C, Chiappella A, Corbelli S, Rott C, Hess G, Wico C, Vitolo U, Neme P, Aurer I, Unterhalt M, Ribrag V, Hoster E, Hermine O: Update on the molecular pathogenesis and clinical treatment of mantle cell lymphoma: report of the 11th annual conference of the European Mantle Cell Lymphoma Network. *Leuk Lymphoma* 2013, **54**:699-707.
2. Jans P, Colomer D, Campo E: Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma. *J Clin Invest* 2012, **122**:3416-3423.
3. Delauney R, Haboun C, Ribrag V, Briche P, Delmer A, Tilly H, Salles G, Van Hoof A, Casanovas O, Brousse N, Leftere F, Hermine O: CHOP and DHAP plus rituximab followed by autologous stem cell transplantation in mantle cell lymphoma: a phase 2 study from the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *Blood* 2013, **121**:48-53.
4. Leftere F, Delmer A, Suzan F, Levy V, Belanger C, Djabari M, Amalfi B, Damaj G, Mallard N, Ribrag V, Janvier M, Sebban C, Casanovas R-Q, Bouabdallah R, Dreyfus F, Verliere V, Delabesse E, Wilenski F, McIntyre E, Brousse N, Varet B, Hermine O: Sequential chemotherapy by CHOP and DHAP regimens followed by high-dose therapy with stem cell transplantation induces a high rate of complete response and improves event-free survival in mantle cell lymphoma: a prospective study. *Leukemia* 2012, **16**:587-593.
5. Marli F, Lumini S, Iarucci F, Petroni M, Visco C, Ambrosetti A, Stalitano C, Caracciolo F, Di Renzo N, Angilli F, Canalis AM, Capodanno J, Barbolini E,

- Gallimberti S, Federico M: Rituximab plus HyperCVAD alternating with high dose cytarabine and methotrexate for the initial treatment of patients with mantle cell lymphoma, a multicentre trial from Gruppo Italiano Studio Linfomi. *Br J Haematol* 2012, **156**:346-353.
6. Ferrero S, Dreyling M: The current therapeutic scenario for relapsed mantle cell lymphoma. *Curr Opin Oncol* 2013, **25**:462-467.
7. Wang ML, Rife S, Martin P, Goy A, Auer R, Kahl BS, Jurczak W, Advani RH, Romaguera JE, Williams ME, Bartenec JC, Chmielowska E, Radford J, Salgnbauer S, Dreyling M, Jedrzejzak WW, Johnson P, Spurgeon SE, Li L, Zhang L, Newbery K, Ou Z, Cheng N, Fang B, McGreevy J, Dow F, Buggy JJ, Chang BY, Boupride DM, Kunkel LA, Blum KA: Targeting BTK with ibrutinib in relapsed or refractory mantle-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2013, **369**:507-516.
8. Goy A, Sinha R, Williams ME, Kalayoglu Bekdik S, Drach J, Ramchandran R, Zhang J, Corro S, Fu T, Witzig TE: 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.
9. Goy A, Younes A, McLaughlin P, Pro R, Romaguera JE, Hagmelter F, Fayad L, Dang NH, Samaniego F, Wang M, Boglio K, Samuels B, Gilles F, Saris AH, Hart S, Trehu E, Scherkein D, Cabanillas F, Rodriguez AM: Phase II study of proteasome inhibitor bortezomib in relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2005, **23**:667-675.
10. Ansell SM, Tang H, Kurtin P, Koenig PA, Inwards DJ, Shah K, Ziesmer SC, Feldman AL, Rao R, Gupta M, Brichman C, Witzig TE: Temsirolimus and rituximab in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma: a phase 2 study. *Lancet Oncol* 2011, **12**:361-368.
11. Witzig TE, Geyer SM, Ghobrial L, Inwards DJ, Fonseca R, Kurtin P, Ansell SM, Luyun R, Flynn PJ, Morton RF, Dakhil SR, Gross H, Kaufmann SH: Phase II trial of single-agent temsirolimus (CCI-779) for relapsed mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2005, **23**:5347-5356.
12. Vose JM: Mantle cell lymphoma: 2012 update on diagnosis, risk stratification, and clinical management. *Am J Hematol* 2012, **87**:604-608.
13. Robak T, Lech-Maranda E, Janus A, Biondi J, Wierzbowska A, Gora-Tybor J: Cladribine combined with cyclophosphamide and mitoxantrone is an active salvage therapy in advanced non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2007, **48**:1092-1101.
14. Monchhausier F, Depil S, Jourdan E, Wetterwald M, Bouabdallah R, Mart G, Sidal-Caligny P, Sebhan C, Coiffier B, Chouaki N, Bauders P, Dumontet C: Phase II study of gemtazabine-decamethasone with or without displatein in relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *Ann Oncol* 2007, **18**:370-375.
15. Johnson SA: Use of fludarabine in the treatment of mantle cell lymphoma, Waldenström's macroglobulinemia and other uncommon B- and T-cell lymphoid malignancies. *Hematol J* 2004, **5**(suppl 1):S50-S61.
16. Visco C, Finotto S, Zambello R, Facchini R, Marin A, Zinzari R, Zaja F, Semenzato G, Pizzolo G, D'Amore ESG, Rodighiero F: Combination of rituximab, bendamustine, and cytarabine for patients with mantle-cell non-Hodgkin lymphoma ineligible for intensive regimens or autologous transplantation. *J Clin Oncol* 2013, **31**:1442-1449.
17. Ellison RR, Holland JF, Wall M, Jacquilat C, Bolan M, Bernard J, Sawitsky A, Roemer F, Gussoff B, Silver RT, Karanas A, Cutler J, Spurr CL, Hayes DM, Blom J, Leone LA, Haurand F, Kyle R, Hutchison JL, Forcier R, Moon JH: Arabinosyl cytosine: a useful agent in the treatment of acute leukemia in adults. *Blood* 1968, **32**:507-523.
18. Kantarjian H, Barlogie B, Plunkett W, Velasco W, McLaughlin P, Riggs S, Calinikas F: High-dose cytosine arabinoside in non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 1983, **1**:689-694.
19. Capizzi RL: Curative chemotherapy for acute myeloid leukemia: the development of high-dose ara-C from the laboratory to bedside. *Invest New Drugs* 1996, **14**:249-256.
20. Lamba JK: Genetic factors influencing cytarabine therapy. *Pharmacogenomics* 2008, **10**:1657-1674.
21. Clarke ML, Damaraju VL, Zhang J, Mowles D, Tackabery T, Tang T, Smith KM, Young JD, Tomkinson B, Cass CE: The role of human nucleoside transporters in cellular uptake of 4'-thio-beta-D-arabino-furanosylcytosine and beta-D-arabino-furanosylcytosine. *Mol Pharmacol* 2006, **70**:308-310.
22. Capizzi RL, White JC, Powell BL, Perrino F: Effect of dose on the pharmacokinetic and pharmacodynamic effects of cytarabine. *Semin Hematol* 1991, **28**(3 Suppl 4):54-69.
23. Cai J, Damaraju VL, Groulx N, Mowles D, Peng Y, Robins MJ, Cass CE, Gros P: Two distinct molecular mechanisms underlying cytarabine resistance in human leukemic cells. *Cancer Res* 2008, **68**:2349-2357.
24. Hubek I, Scam RW, Peters GI, Broekhuizen R, Meijerik JRP, van Wering ER, Gibson BE, Crestig U, Zwaan CM, Cloos J, Rulk DJ, Peters R, Kaspers GL: The human equilibrative nucleoside transporter 1 mediates in vitro cytarabine activity in childhood acute myeloid leukaemia. *Br J Cancer* 2005, **93**:1388-1394.
25. Tang J, Xie X, Zhang X, Qiao X, Jiang S, Shi W, Shao Y, Zhou X: Long term cultured HL-60 cells are intrinsically resistant to Ara-C through high CDA activity. *Prost Biol (Londondr Ed)* 2012, **17**:569-574.
26. DiAngelis LM, Kreis W, Chan K, Dandis E, Avramis S: Pharmacokinetics of ara-C and ara-U in plasma and CSF after high-dose administration of cytosine arabinoside. *Cancer Chemother Pharmacol* 1992, **29**:173-177.
27. Qin T, Jilnik J, Si J, Shu J, Isa JP: Mechanisms of resistance to 5-aza-2'-deoxycytidine in human cancer cell lines. *Blood* 2009, **113**(6):659-667.
28. Ewald B, Sampath D, Plunkett W: Nucleoside analogs: molecular mechanisms signaling cell death. *Oncogene* 2008, **27**:6522-6537.
29. Galmarini CM, Mackey JR, Dumontet C: Nucleoside analogues: mechanisms of drug resistance and reversal strategies. *Leukemia* 2001, **15**:875-890.
30. Visco C, Castagnaro S, Chiaregato K, Bernardi M, Ablero E, Zanoni C, Madoe D, Rodighiero F: The cytotoxic effects of bendamustine in combination with cytarabine in mantle cell lymphoma cell lines. *Blood Cells Mol Dis* 2012, **48**:68-75.
31. Hirada N, Nishii I, Yamauchi T, Koyama D, Wada T, Uesawa M, Akutsu M, Mori S, Nakamura Y, Ueda T, Nao Y, Furukawa Y: Purine analog-like properties of bendamustine underlie rapid activation of DNA damage response and synergistic effects with pyrimidine analogues in lymphoid malignancies. *PLoS One* 2014, **9**:1-14.
32. Klanova M, Soukup T, Jaska R, Molinsky J, Latockova L, Marwabi BC, Prukova D, Brestnova J, Michalova K, Vockova P, Hernandez-Ilizaliturri F, Kulvait V, Zivny J, Vokurka M, Necas E, Timmy M, Mliner P: Mouse models of mantle cell lymphoma, complex changes in gene expression and phenotype of engrafted MCL cells: implications for preclinical research. *Lab Invest* in press.

doi:10.1186/1476-2875-13-159
Cite this article as: Klanova et al.: Downregulation of deoxycytidine kinase in cytarabine-resistant mantle cell lymphoma cells confers cross-resistance to nucleoside analogs gemtazabine, fludarabine and cladribine, but not to other classes of anti-lymphoma agents. *Molecular Cancer* 2014, **13**:159.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at www.biomedcentral.com/submit



9 DISKUSE

9.1 Publikace číslo 1:

Zavedli a charakterizovali jsme několik myších modelů lidského MCL pomocí xenotransplantace primárních buněk a ustálených buněčných linií MCL do imunodeficitních myší. Nejprve jsme prokázali, že i primární buňky MCL se přihojují v subletálně ozářených imunodeficitních myších (NOD.Cg-*Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ*, NSG myši). Vedle přihojení a proliferace převážně cyklin D1+ buněk (buňky izolované od pacientů: VFN-1, VFN-4 a VFN-10), jsme také pozorovali přihojení směsi cyklin D1+, CD20+ a CD3+ buněk (VFN-3, VFN-6, VFN-7 a VFN-8). Ve třech případech (VFN-2, VFN-11 a VFN-12) jsme po xenotransplantaci primárních MCL buněk detekovali přihojení B lymfocytárních klonů pozitivních na virus Epstein-Barrové (EBV). Z uvedeného vyplývá, že myší modely lidského MCL vytvořené xenotransplantací primárních buněk jsou využitelné, avšak tento přístup je zatížen nekonstantním přihojováním primárních buněk a vyžaduje imunohistochemickou analýzu k ověření přihojení MCL buněk (cyklin D1+) a vyloučení proliferace nenádorových buněk, např. T lymfocytů nebo EBV pozitivních B buněčných klonů. V některých případech je pak možné primární buňky ve velkém počtu izolovat z infiltrovaných orgánů (nejčastěji ze zvětšené sleziny) primárních myších recipientů a použít pro retransplantaci do dostatečného počtu sekundárních příjemců.

I když se některé primární buňky úspěšně přihojují v imunodeficitních myších (Chapuy, Cheng et al. 2016; Townsend, Murakami et al. 2016), je nutné zdůraznit, že většina v současné době publikovaných prací využívá pro preklinické testování experimentálních látek myší modely založené na xenotransplantaci ustálených buněčných linií do imunodeficitních myší. Většinou jsou to modely založené na xenotransplantaci nádorových buněk do podkoží imunodeficitních myší, zatímco modely systémového onemocnění vyžadující intravenózní aplikaci buněk jsou používány zřídka (Prasad, Shrivastava et al. 2013; Barth, Mavis et al. 2015; Mani, Chiang et al. 2015). Navíc je velice málo známo o způsobu přihojování a šíření lymfomových buněk v myši po xenotransplantaci, stejně jako o fenotypových změnách lymfomových buněk, ke kterým může docházet vlivem mikroprostředí jednotlivých myších tkání.

V naší práci jsme podrobně studovali a popsali přihojení a šíření 5 komerčně dostupných a široce používaných buněčných linií MCL (Mino, Jeko-1, Granta-519,

Hbl-2 a Rec-1) v imunodeficitních NSG myších. Na rozdíl od primárních buněk MCL, které jsou po xenotransplantaci nejdříve detekovány v myší slezině, hlavním místem přihojení buněčných linií MCL je kostní dřeň, odkud se buňky šíří do sleziny, jater a dále v průběhu onemocnění do centrálního nervového systému a ledvin. K infiltraci dalších orgánů a tkání, jako jsou lymfatické uzliny, vaječníky nebo periferní krev dochází jen u některých buněčných linií MCL. Průměrná doba přežití myší xenotransplantovaných buněčnými liniemi MCL se pohybuje v rozmezí od 22±1 do 54±3 dnů. Biologicky nejagresivněji se *in vivo* chová linie Granta-519, ačkoliv *in vitro* má tato linie nejnižší proliferativní aktivitu. Důvody pro rozdílné chování jednotlivých linií *in vivo* jsou nejasné.

Analýzou genové exprese jsme zjistili, že buňky MCL rostoucí *in vivo* v různých myších tkáních mají odlišný profil genové exprese a fenotyp ve srovnání s *in vitro* rostoucími buňkami. Geny kódující chemokiny nebo chemokinové receptory jako CXCL10, CCL3, CCL3L3, CCL4L1, CCL4L2, CXCR4, nebo CCR7 patří k nejvíce deregulovaným genům *in vivo* ve srovnání s *in vitro* rostoucími buňkami. Tento fakt podtrhuje význam vlivu mikroprostředí myších orgánů na fenotyp MCL buněk. Geny účastnící se oxidativní fosforylace patří k nejvíce sníženě exprimovaným, naopak geny kódující molekuly účastnící se signální kaskády spouštěné B buněčným receptorem jsou nejvíce zvýšeně exprimovány. Předpokládáme, že po přihojení v imunodeficitních myších dochází u MCL buněk ke komplexním změnám genové exprese a fenotypu v důsledku adaptace na mikroprostředí myších tkání, kde jsou buňky vystaveny hypoxii, nedostatku živin, interakci s dalšími buňkami a antigeny. Není proto překvapující, že myši retransplantované MCL buňkami izolovanými z primárních příjemců mají významně kratší přežití než myši transplantované kontrolními, *in vitro* rostoucími buňkami.

Dále jsme prokázali, že zavedené myší modely mohou být použity pro preklinické testování experimentálních léčiv. Zajímavé je, že jsme zaznamenali významný rozdíl mezi *in vitro* senzitivitou MCL buněk k některým protilymfomovým látkám a efektivitou těchto látek *in vivo* při terapii myší se systémovým MCL onemocněním. I přesto, že se letální dávka (LD100) gemcitabinu a bortezomibu u buněčné linie Jeko-1 pohybuje *in vitro* v nanomolárních koncentracích (LD100 gemcitabinu (10nM/L), bortezomibu (16nM/L)), bortezomib neprodlužuje celkové přežití myší se systémovým MCL onemocněním a gemcitabin nevede k jeho vyléčení. Předpokládáme, že často pozorovaná diskrepance mezi excelentní *in vitro*

senzitivitou k dané látce a její špatnou efektivitou *in vivo*, může být dána změnami fenotypu buněk, ke kterým dochází po xenotransplantaci. Také jsme ukázali, že imunomodulační látka lenalidomid, jejíž protinádorový mechanismus je dán ovlivněním nádorového mikroprostředí (Hernandez-Ilizaliturri, Reddy et al. 2005), neprodlužuje celkové přežití myši xenotransplantovaných buněčnými liniemi MCL (Jeko-1, Mino), ale signifikantně prodlužuje celkové přežití myši xenotransplantovaných NEMO buňkami (primární buňky odvozené od pacienta s MCL = VFN1). Na rozdíl od Jeko-1 a Mino buněk, pokud jsou NEMO buňky izolovány z myších tkání a kultivovány *in vitro*, rychle podléhají apoptóze, což naznačuje jejich závislost na mikroprostředí myších tkání. Předpokládáme, že právě ovlivnění mikroprostředí při terapii lenalidomidem je zodpovědné za prodloužení celkového přežití myši xenotransplantovaných NEMO buňkami. Myši xenotransplantované NEMO buňkami tak představují vhodný *in vivo* model pro studium mechanismů protinádorového účinku lenalidomidu.

Závěrem, zavedli a charakterizovali jsme myší modely lidského MCL vytvořené xenotransplantací ustálených buněčných linií a primárních buněk do imunodeficitních myší. Prokázali jsme, že buňky přiložené a proliferující v myších tkáních jsou biologicky odlišné a mají komplexní změny genové exprese, imunofenotypu a senzitivity k cytotoxickým látkám ve srovnání s *in vitro* rostoucími MCL liniemi. Tyto závěry mohou být významným přínosem pro preklinický výzkum.

9.2 Publikace číslo 2:

Na základě výsledků několika klinických studií, které testovaly účinnost HDAC jako součásti indukčních chemoterapeutických režimů v léčbě pacientů s MCL se cytarabin stal standardní součástí terapie MCL (Lefrere, Delmer et al. 2002; Delarue, Haioun et al. 2013). Režimy s HDAC tak nahradily či jsou kombinovány s dříve používanými antracyklinovými režimy (CHOP). Vedle kombinace cytarabinu s cisplatinou a kortikoidy (režim DHAP) byla na příklad testována alternace režimu R-hyperCVAD (rituximab, frakcionovaný cyklofosfamid, vinkristin, doxorubicin, dexamethazon) s vysokodávkovaným metotrexátem a cytarabinem (R-HD-Mtx/AraC), která ve srovnání s historickými kontrolami navodila větší procento kompletních remisí a prodloužila celkové přežití pacientů s MCL (Romaguera, Fayad et al. 2005). Dalším běžně používaným režimem je Nordický protokol založený na kombinované imunochemoterapii rituximabem a intenzifikovaným režimem CHOP (R-maxi-CHOP) v alternaci s vysokodávkovaným cytarabinem (R-HDAC) (Geisler, Kolstad et al.

2008). Pravděpodobně žádná klinická studie není schopna porovnat jednotlivé léčebné přístupy, tudíž zůstává nejasné, která komponenta jednotlivých režimů či jejich kombinace vedla k prodloužení celkového přežívání pacientů s MCL. V této práci jsme se zaměřili na otázku, která součást režimu DHAP (cisplatina, cytarabin, případně kombinace obou) je klíčová pro jeho vysokou efektivitu. S použitím myšního modelu agresivního lidského MCL jsme experimentálně porovnali účinnost monoterapie cisplatinou, cytarabinem a tří různých kombinací obou látek (Klanova, Soukup et al. 2014). Jednotlivé terapeutické přístupy byly předem otestovány a dávkově upraveny tak, aby měly stejnou toxicitu, což je nezbytný předpoklad pro možnost jejich vzájemného porovnání. Prokázali jsme, že cisplatina v monoterapii či kombinace cisplatinu s cytarabinem je účinnější ve srovnání s monoterapií cytarabinem. Naše závěry tak nepřímou potvrzují výsledky klinické studie Nordické lymfomové skupiny, která testovala účinnost cytarabinu v kombinaci s rituximabem (bez další cytotoxické látky) u pacientů s agresivním MCL, a musela být předčasně ukončena pro nedostatečnou efektivitu (Laurell, Kolstad et al. 2014). Naše práce také naznačuje, že cisplatina, i přes známou toxicitu této látky (Delarue, Haioun et al. 2013), je účinným cytostatikem, alespoň v případě agresivních forem MCL.

9.3 Publikace číslo 3:

Zvýšená exprese antiapoptického proteinu BCL2 bývá nacházena u části DLBCL a je u tohoto onemocnění asociována s nepříznivou prognózou (Hermine, Haioun et al. 1996). Cílená inhibice proteinu BCL2 pomocí specifického nízkomolekulárního inhibitoru, látky s názvem ABT-199 představuje perspektivní léčebnou strategii u některých typů B-NHL. Dle výsledků časných klinických studií testujících ABT-199 v monoterapii u pacientů s relabujícími B-NHL, je však efektivita této cílené terapie u DLBCL méně zřejmá (Davids, Roberts et al. 2012). Je nutné zdůraznit, že deregulace genu *BCL2* vedoucí ke zvýšené expresi antiapoptického proteinu BCL2 se uplatňuje jen u části DLBCL, ve zbylých případech nelze protein BCL2 detekovat pomocí imunohistochemické analýzy (Kendrick, Redd et al. 2014). Přesto míra exprese proteinu BCL2 není kritériem pro zařazování pacientů s DLBCL do klinických studií testujících efektivitu ABT-199 (Davids MS). V této práci jsme studovali význam hlavních antiapoptických proteinů rodiny BCL2 (BCL2, MCL1 a BCL-XL) pro přežívání buněk DLBCL a dopad jejich cílené inhibice.

Nejprve jsme porovnali expresní profil BCL2 proteinů (BCL2, MCL1 a BCL-XL) u 18 linií DLBCL a 105 primárních vzorků získaných od pacientů s nově diagnostikovaným DLBCL. Zjistili jsme, že buněčné linie DLBCL představují klinicky relevantní model a využili tyto linie k objasnění námi vytyčených cílů. Ve shodě s dříve publikovanými pracemi jsme zjistili, že absence proteinu BCL2 je asociována s rezistencí na ABT-199 (Souers, Levenson et al. 2013). Látka ABT-199 by tak neměla být používána pro terapii BCL2 negativních DLBCL. Na druhou stranu předpokládáme jeho vysokou účinnost u větší části BCL2 pozitivních DLBCL, pro které se zdá být přítomnost BCL2 proteinu a jím navozená inhibice apoptózy nezbytná pro přežívání lymfomových buněk. Na základě citlivosti DLBCL linií vůči inhibici antiapoptotického proteinu BCL2 (pomocí ABT-199) a MCL1 (pomocí homoharingtoninu, HHT) jsme zjistili, že linie DLBCL mohou být rozděleny do 3 hlavních kategorií: MCL1 dependentní/BCL2 independentní, dominantně BCL2 dependentní (BCL2 > MCL1) a MCL1/BCL-2 dependentní. Konkrétně, 9 buněčných linií DLBCL (SU-DHL-4, SU-DHL-5, SU-DHL-10, OCI-LY-7, BJAB, HT, Karpas-422, NUDUL-1 a UPF4D) bylo senzitivních k HHT, ale rezistentních k ABT-199, což ukazuje na jejich dependenci na antiapoptotickém proteinu MCL1. Z 8 DLBCL linií, které byly citlivé na obě látky, bylo 5 buněčných linií (RIVA, OCI-Ly2, OCI-Ly19, HBL-1 a U-2932) významně citlivějších k ABT-199 ve srovnání s HHT, což značí jejich dominantní závislost na antiapoptotickém proteinu BCL2 (BCL2 > MCL1). 3 buněčné linie (NU-DHL-1, OCI-Ly3 a TMD8) byly citlivé k oběma látkám, a tedy závislé jak na antiapoptotickém proteinu BCL2, tak MCL1. Pouze 1 buněčná linie (HT) byla rezistentní k oběma látkám, tedy nezávislá na antiapoptotickém působení proteinů BCL2 a MCL1.

Výsledky, které jsme získali odvozením klonů DLBCL linií se změněnou expresí proteinů BCL2, MCL1 a BCL-XL, potvrdily předkládané rozdělení DLBCL na biologicky odlišné kategorie dle závislosti na antiapoptotickém proteinu BCL2 a/nebo MCL1. Role antiapoptotického proteinu BCL-XL u DLBCL se zdá být ve srovnání s proteiny BCL2 a MCL1 minoritní. Tuto teorii podporuje zejména téměř identická citlivost DLBCL linií k ABT-199 a k ABT-737 (inhibitor BCL-2, BCL-XL a BCL-w). Toto pozorování (v souladu s dříve publikovanými daty) naznačuje, že inhibice antiapoptotického proteinu BCL2, nikoliv BCL-XL je klíčovým molekulárním mechanismem, který vede ke smrti buněk (Deng, Carlson et al. 2007). Na druhou stranu jsme ukázali, že snížení exprese proteinu BCL-XL zvyšuje senzitivitu DLBCL linií k HHT, analogicky zvýšení exprese proteinu BCL-XL snižuje senzitivitu DLBCL linií

k HHT. Navíc získaná rezistence DLBCL linií k HHT je spojená se zvýšením exprese proteinu BCL-XL. Z těchto výsledků vyplývá, že získané zvýšení exprese proteinu BCL-XL může snižovat závislost DLBCL linií na antiapoptotickém proteinu MCL1.

Zvýšení exprese proteinu BCL2 u původně BCL2 negativních linií (SU-DHL-5, UPF4D) nevede k indukci citlivosti BCL2 negativních (ABT-199 rezistentních) linií k ABT-199, což je v souladu s dříve publikovanými daty (Deng, Carlson et al. 2007). Na druhou stranu zvýšení exprese proteinu BCL2 významně snižuje citlivost k HHT. Prokázali jsme, že zvýšeně exprimovaný protein BCL2 může sekvestrovat proapoptotický protein BIM uvolněný z proteinu MCL1 vlivem HHT. Tato data částečně vysvětlují fakt, že BCL2 negativní linie jsou citlivější k HHT ve srovnání s BCL2 pozitivními liniemi (61.9 ± 28.7 % vs. 38.2 ± 32.3 % průměrná míra apoptózy po 24-hodinové inkubaci s 30 nmol/L HHT, $P = 0.07$).

Zatímco závislost DLBCL linií na antiapoptotickém proteinu BCL2 může být spolehlivě testována pomocí ABT-199, určení závislosti DLBCL linií na antiapoptotickém proteinu MCL1 je vzhledem k nedostatku jeho specifických inhibitorů obtížné. Na základě výsledků získaných odvozením klonů se změněnou expresí MCL1 proteinu od HHT-vysoce senzitivní linie Karpas-422 a HHT-nízce senzitivní linie U2932 se zdá, že pouze DLBCL linie vysoce senzitivní k HHT jsou závislé na antiapoptotickém proteinu MCL1. Zatímco apoptóza navozená HHT u linií s nízkou senzitivitou k HHT může být důsledkem dalších protinádorových mechanismů HHT (snížení exprese proteinu MYC, BCL6, cFLIP). Tuto hypotézu jsme podpořili analýzou proteinů, které se u jednotlivých linií vážou na MCL1. Metodou proteinové imunoprecipitace jsme prokázali, že pouze u linií vysoce senzitivních k HHT (UPF4D, SU-DHL-5, NU-DHL-1, NU-DUL-1) sekvestruje protein MCL1 přímý aktivátor apoptózy BIM. Na druhou stranu protein MCL1 izolovaný z buněčných linií nízce senzitivních k HHT (U2932 a HT) váže protein NOXA, tzv. senzitizer apoptózy. Již dříve bylo prokázáno, že pouze buňky, jejichž antiapoptotický protein BCL2 (např. MCL1) váže přímý aktivátor apoptózy (např. protein BIM), jsou na tomto BCL2 proteinu přímo závislé, a tudíž jeho inhibice vyvolá uvolněním přímých aktivátorů apoptózy smrt buněk (Certo, Del Gaizo Moore et al. 2006).

Naše data naznačují, že DLBCL může být rozdělen na biologicky odlišné skupiny závislé na antiapoptotickém proteinu BCL2 a/nebo MCL1. Zatímco podskupina BCL2 pozitivních DLBCL obsahuje jak BCL2, tak MCL1 dependentní případy, které mohou být farmakologicky inhibovány pomocí ABT-199, HHT, či jejich kombinace (s

významným synergickým efektem), podskupina BCL2 negativních DLBCL se zdá být převážně závislá na proteinu MCL1. V souladu s dříve publikovanými pracemi i naše výsledky ukazují, že farmakologická inhibice proteinu MCL1 se zdá být racionálním terapeutickým přístupem u DLBCL (Li, Pongtornpipat et al. 2015). V naší práci jsme k inhibici proteinu MCL1 použili HHT. Molekulárním mechanismem protinádorového účinku HHT je inhibice translace proteinů. Jsme si vědomi, že smrt buněk DLBCL vyvolaná HHT je vedle snížení exprese proteinu MCL1 dána i ovlivněním exprese dalších proteinů (Chen, Guo et al. 2011; Lindqvist, Vikstrom et al. 2012). Přesto jsme prokázali, že proapoptotický účinek HHT u HHT-vysoce senzitivních linií je dán právě snížením exprese proteinu MCL1. Závěrem lze říct, že ABT-199 může být účinným lékem u DLBCL, avšak pouze ve skupině BCL2 pozitivních případů. Na druhou stranu HHT se zdá být slibným lékem pro terapii DLBCL bez ohledu na expresní stav BCL2 proteinu, přestože se zdá být účinnějším u BCL2 negativních DLBCL. Současná inhibice proteinu BCL2 a MCL1 (v naší studii pomocí ABT-199 a HHT) vykazuje významný synergický účinek u většiny BCL2 pozitivních DLBCL a představuje tak novou léčebnou strategii pro tuto podskupinu DLBCL, což jsme prokázali také *in vivo* na myším modelu vytvořeném xenotransplantací primárních buněk DLBCL do imunodeficitních myší. Vzhledem k tomu, že HHT je schváleným protinádorovým lékem a ABT-199 v pokročilých stádiích klinického testování u B-NHL, naše výsledky mohou mít přímý dopad na nové koncepty experimentální terapie DLBCL cílené na inhibici proteinů BCL2 a/nebo MCL1 pomocí ABT-199 a HHT, v monoterapii či kombinaci.

9.4 Publikace číslo 4:

V této práci jsme studovali molekulární mechanismy získané rezistence MCL na cytarabin. Dále jsme si položili otázku, jaká je optimální léčebná strategie pro pacienty s MCL, kteří byli v primoterapii léčeni cytarabinem, a dochází u nich k progresi či relapsu onemocnění. Analyzovali jsme pět ustálených buněčných linií MCL se získanou rezistencí k cytarabinu (námi odvozené klony) a deset párových primárních vzorků izolovaných od pacientů s MCL v době diagnózy a po léčbě cytarabinem (při progresi či relapsu onemocnění). V porovnání s kontrolními cytarabin-senzitivními buněčnými liniemi a diagnostickými primárními vzorky jsme u všech MCL linií se získanou rezistencí na cytarabin a u 50 % primárních vzorků izolovaných při progresi (1 ze 2 případů) či relapsu (4 z 8 případů) MCL detekovali sníženou expresi DCK (na

úrovni mRNA i proteinu). DCK je enzym, který se účastní syntézy nukleotidů cestou tzv. záchranné dráhy, při níž nejsou puriny a pyrimidiny tvořeny de novo, ale jsou syntetizovány z produktů (nukleosidů a bazí) degradace RNA či DNA. Kromě syntézy nukleotidů je funkční DCK nezbytná pro metabolismus cytarabinu po jeho vstupu do buňky, kdy jej fosforyluje a tudíž aktivuje (Lamba 2009). Snížení exprese tohoto enzymu tak může způsobovat rezistenci nádorových buněk na cytarabin, což již bylo popsáno u akutní myeloidní leukémie (Song, Kim et al. 2009). Ačkoliv jsme snížení exprese DCK detekovali u 50 % primárních vzorků izolovaných od pacientů po léčbě cytarabinem, u zbylých 50 % vzorků jsme nezaznamenali žádnou změnu exprese DCK, z čehož vyplývá, že mechanismy rezistence MCL na cytarabin *in vivo* jsou ve srovnání s *in vitro* pozorováními komplexnější. U jednoho ze dvou primárních vzorků získaných od pacientů s progresí na léčbě cytarabinem (primární rezistence na cytarabin) jsme nepozorovali žádnou změnu exprese DCK a mírně vyšší senzitivitu na cytarabin u MCL buněk izolovaných po léčbě cytarabinem ve srovnání s MCL buňkami izolovanými před podáním cytarabinu. Tento stav by mohl být vysvětlen přítomností cytarabin-rezistentních lymfomových kmenových buněk, které přežívají v lymfatických uzlinách či kostní dřeni a produkují částečně cytarabin-senzitivní klony, které jsou uvolňovány do periferní krve. V takovém případě by eliminace MCL buněk uvolněných do periferní krve a zároveň přetrvávání lymfomových kmenových buněk vedla ke stabilní chorobě či progresi onemocnění na léčbě, což by odpovídalo klinickému průběhu onemocnění u tohoto pacienta.

DCK je enzym, který po vstupu do buňky fosforyluje a aktivuje cytarabin a také další nukleosidová analoga (purinová i pyrimidinová) používaná v protinádorové léčbě (Galmarini, Mackey et al. 2001; Ewald, Sampath et al. 2008). V souladu s tím jsme prokázali, že všechny buněčné linie MCL rezistentní k cytarabinu jsou zkříženě rezistentní k pyrimidinovému analogu gemcitabinu a purinovým analogům fludarabinu a kladribinu. Naopak senzitivita cytarabin-rezistentních MCL linií k dalším protilymfomovým látkám včetně vybraných cytostatik (cisplatina, doxorubicin, bendamustin), cílených léků (temsirolimus, bortezomib) či monoklonálních protilátek (rituximab) zůstala nezměněna anebo byla dokonce vyšší (ibrutinib). Ibrutinib je inhibitor BTK, tedy molekuly, která je klíčovou pro signalizační dráhu BCR (Honigberg, Smith et al. 2010). Možným důvodem pro zvýšení senzitivity cytarabin-rezistentních klonů k ibrutinibu je pozorovaná aktivace této signální dráhy na úrovni mRNA u cytarabin-rezistentních klonů ve srovnání s kontrolními MCL buňkami.

Senzitivita cytarabin-rezistentních MCL linií k panelu protilymfomových látek (*in vitro* i *in vivo* na myším modelu lidského MCL) a pozorovaná snížená exprese DCK u cytarabin-rezistentních MCL linií a poloviny primárních MCL po léčbě cytarabinem ukazuje, že rezistence MCL k cytarabinu je dána omezenou schopností jeho aktivace při snížené expresi DCK. Zkřížená rezistence cytarabin-rezistentních linií MCL ke všem testovaným nukleosidovým analogům je vysvětlitelná faktem, že všechny tyto látky jsou substrátem DCK. Naopak zachovaná senzitivita k dalším protilymfomovým látkám (s různými mechanismy účinku) nepřímo ukazuje na jednotný mechanismus cytarabinové rezistence.

Prognóza pacientů s relabujícím či terapeuticky refrakterním MCL je špatná. V současné době neexistuje standardní léčebná strategie pro pacienty s relapsem MCL (Ferrero and Dreyling 2013). K dispozici jsou chemoterapeutické režimy 2. linie, které zahrnují cytostatika jako je cisplatina, fludarabin, gemcitabin nebo bendamustin. Do klinické praxe byly také zavedeny léky ovlivňující nádorové mikroprostředí (lenalidomid), látky inhibující některé aberantně aktivované signální dráhy (temsirolimus, ibrutinib) či inhibitory proteazomu (bortezomib). Prokázali jsme (*in vitro* a *in vivo* na myším modelu MCL), že pacienti, kteří progredují či relabují po režimu založeném na HDAC, by neměli být léčeni nukleosidovými analogy, konkrétně fludarabinem, gemcitabinem a kladribinem. I když předpokládáme, že rezistence k cytarabinu vzniká jen u části z nich, dle našich výsledků je vhodné u těchto pacientů zvolit jinou skupinu protilymfomových látek. Na základě našich výsledků lze také doporučit, aby vysokodávkovaná chemoterapie (podávaná bezprostředně před autologní transplantací kmenových buněk) neobsahovala nukleosidová analoga zejména u pacientů, kteří dosáhli suboptimální léčebné odpovědi (parciální remise onemocnění, detekovatelná minimální reziduální choroba) po indukční terapii založené na cytarabinu. Bendamustin představuje v současné době velmi slibnou terapeutickou možnost pro pacienty s MCL. Bylo prokázáno, že bendamustin potencuje efekt cytarabinu zvýšením intracelulární koncentrace ara-C-trifosfátu a chemoterapeutický režim R-BAC (rituximab, bendamustin, cytarabin) se zdá být efektivní i u pacientů rezistentních k cytarabinu (Visco, Castegnaró et al. 2012; Visco, Finotto et al. 2013; Hiraoka, Kikuchi et al. 2014). Je možné, že zvýšená intracelulární koncentrace ara-CTP může částečně kompenzovat sníženou hladinu DCK, čímž lze vysvětlit fakt, že kombinace bendamustinu s cytarabinem je účinná i u pacientů, kteří relabují po cytarabinu (Visco, Finotto et al. 2013).

10 Závěry

Zavedli a charakterizovali jsme několik modelů lidského MCL pomocí xenotransplantace primárních buněk a ustálených linií MCL do imunodeficitních myší. Naše původní hypotéza se potvrdila, primární buňky se přihojují v imunodeficitních myších, ale na rozdíl od ustálených buněčných linií nejsou schopny proliferace *in vitro*, což naznačuje jejich závislost na nádorovém mikroprostředí. Buňky přihojené a proliferující v myších tkáních jsou ve srovnání s *in vitro* rostoucími MCL buněčnými liniemi biologicky odlišné a vykazují rozdílnou senzitivitu k cytotoxickým látkám. Tyto závěry (Publikace č. 1) mohou být významným přínosem pro preklinický výzkum. S využitím námi odvozených myších modelů lidského MCL jsme experimentálně prokázali, že cisplatina v monoterapii či kombinace cisplatiny s cytarabinem je účinnější ve srovnání s cytarabinem podávaným v monoterapii. Naše původní hypotéza se potvrdila, naše výsledky jsou zároveň v souladu se závěry klinické studie Nordické lymfomové skupiny, která ukázala, že HDAC podávaný v monoterapii není dostatečně účinnou léčbou u agresivních forem MCL (Publikace č.2).

Zjistili jsme, že DLBCL může být rozdělen na biologicky odlišné podskupiny podle závislosti na antiapoptotickém proteinu BCL2 a/nebo MCL1. Podskupina BCL2 pozitivních DLBCL obsahuje jak BCL2-, tak MCL1-dependentní případy, které mohou být farmakologicky inhibovány pomocí cíleného nízkomolekulárního inhibitoru s názvem ABT-199, rostlinného alkaloidu homoharingtoninu, či jejich kombinace (s významným synergickým efektem), podskupina BCL2-negativních DLBCL se zdá být převážně závislá na proteinu MCL1. Tyto výsledky mohou mít přímý dopad na nové koncepty experimentální terapie DLBCL cílené na inhibici proteinů BCL2 a/nebo MCL1 (Publikace č. 3).

Zjistili jsme, že hlavním mechanismem získané rezistence buněk MCL k cytarabinu je snížení exprese DCK, enzymu, který je nezbytný pro fosforylaci, a tedy aktivaci nukleosidových analogů po jejich vstupu do buňky. Snížení exprese DCK vedle rezistence k cytarabinu způsobuje zkříženou rezistenci k dalším nukleosidovým analogům, které jsou používány v léčbě MCL (např. fludarabin, cladribin, gemcitabin). Výsledky naší práce naznačují, že pacienti, kteří progredují či relabují po režimu založeném na HDAC, by neměli být léčeni nukleosidovými analogy, konkrétně fludarabinem, gemcitabinem a cladribinem (Publikace č. 4).

Věříme, že výsledky naší práce mohou mít dopad na vývoj a testování nových léčebných strategií u DLBCL a MCL.

11 LITERÁRNÍ ZDROJE

- Acehan, D., X. Jiang, et al. (2002). "Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation." *Mol Cell* **9**(2): 423-432.
- Aggarwal, B. B. (2003). "Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword." *Nat Rev Immunol* **3**(9): 745-756.
- Alizadeh, A. A., M. B. Eisen, et al. (2000). "Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling." *Nature* **403**(6769): 503-511.
- Ashkenazi, A. (2002). "Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily." *Nat Rev Cancer* **2**(6): 420-430.
- Barth, M. J., C. Mavis, et al. (2015). "Ofatumumab Exhibits Enhanced In Vitro and In Vivo Activity Compared to Rituximab in Preclinical Models of Mantle Cell Lymphoma." *Clin Cancer Res* **21**(19): 4391-4397.
- Bea, S., M. Ribas, et al. (1999). "Increased number of chromosomal imbalances and high-level DNA amplifications in mantle cell lymphoma are associated with blastoid variants." *Blood* **93**(12): 4365-4374.
- Bea, S., I. Salaverria, et al. (2009). "Uniparental disomies, homozygous deletions, amplifications, and target genes in mantle cell lymphoma revealed by integrative high-resolution whole-genome profiling." *Blood* **113**(13): 3059-3069.
- Bea, S., R. Valdes-Mas, et al. (2013). "Landscape of somatic mutations and clonal evolution in mantle cell lymphoma." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(45): 18250-18255.
- Bertoli, C., J. M. Skotheim, et al. (2013). "Control of cell cycle transcription during G1 and S phases." *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**(8): 518-528.
- Biegging, K. T., S. S. Mello, et al. (2014). "Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression." *Nat Rev Cancer* **14**(5): 359-370.
- Bodrug, S. E., B. J. Warner, et al. (1994). "Cyclin D1 transgene impedes lymphocyte maturation and collaborates in lymphomagenesis with the myc gene." *EMBO J* **13**(9): 2124-2130.
- Bonadonna, G., R. Zucali, et al. (1975). "Combination chemotherapy of Hodgkin's disease with adriamycin, bleomycin, vinblastine, and imidazole carboxamide versus MOPP." *Cancer* **36**(1): 252-259.
- Bosch, F., P. Jares, et al. (1994). "PRAD-1/cyclin D1 gene overexpression in chronic lymphoproliferative disorders: a highly specific marker of mantle cell lymphoma." *Blood* **84**(8): 2726-2732.
- Brack, C., M. Hiram, et al. (1978). "A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination." *Cell* **15**(1): 1-14.
- Brenner, D., H. Blaser, et al. (2015). "Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die." *Nat Rev Immunol* **15**(6): 362-374.
- Brown, J. R., B. Tesar, et al. (2015). "Obatoclox in combination with fludarabine and rituximab is well-tolerated and shows promising clinical activity in relapsed chronic lymphocytic leukemia." *Leuk Lymphoma*: 1-7.
- Camacho, E., L. Hernandez, et al. (2002). "ATM gene inactivation in mantle cell lymphoma mainly occurs by truncating mutations and missense mutations involving the phosphatidylinositol-3 kinase domain and is associated with increasing numbers of chromosomal imbalances." *Blood* **99**(1): 238-244.
- Campo, E., S. H. Swerdlow, et al. (2011). "The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications." *Blood* **117**(19): 5019-5032.
- Certo, M., V. Del Gaizo Moore, et al. (2006). "Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members." *Cancer Cell* **9**(5): 351-365.
- Cohen, P. and S. Frame (2001). "The renaissance of GSK3." *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(10): 769-776.

- Coiffier, B., E. Lepage, et al. (2002). "CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma." *N Engl J Med* **346**(4): 235-242.
- Coiffier, B., C. Thieblemont, et al. (2010). "Long-term outcome of patients in the LNH-98.5 trial, the first randomized study comparing rituximab-CHOP to standard CHOP chemotherapy in DLBCL patients: a study by the Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte." *Blood* **116**(12): 2040-2045.
- Dal Col, J., P. Zancai, et al. (2008). "Distinct functional significance of Akt and mTOR constitutive activation in mantle cell lymphoma." *Blood* **111**(10): 5142-5151.
- Dal Porto, J. M., S. B. Gauld, et al. (2004). "B cell antigen receptor signaling 101." *Mol Immunol* **41**(6-7): 599-613.
- Danovi, D., E. Meulmeester, et al. (2004). "Amplification of Mdmx (or Mdm4) directly contributes to tumor formation by inhibiting p53 tumor suppressor activity." *Mol Cell Biol* **24**(13): 5835-5843.
- Dauids, M. S. and A. Letai (2012). "Targeting the B-cell lymphoma/leukemia 2 family in cancer." *J Clin Oncol* **30**(25): 3127-3135.
- Dauids MS, R. A., Anderson MA, et al. (2013). The Bcl-2 inhibitor ABT-199 (GDC-0199) is active and well tolerated in patients with relapsed/refractory mantle cell lymphoma (MCL) and other non-Hodgkin lymphomas (NHL),
- Dauids MS, R. A., Anderson MA, Pagel JM, Kahl BS, Gerecitano JF "The BCL-2-Specific BH3-Mimetic ABT-199 (GDC-0199) Is Active and Well-Tolerated in Patients with Relapsed Non-Hodgkin Lymphoma: Interim Results of a Phase I Study." *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* **2012;120:304**.
- Dauids, M. S., A. W. Roberts, et al. (2012). "The BCL-2-Specific BH3-Mimetic ABT-199 (GDC-0199) Is Active and Well-Tolerated in Patients with Relapsed Non-Hodgkin Lymphoma: Interim Results of a Phase I Study." *ASH Annual Meeting Abstracts* **120**(21): 304-.
- Davis, R. E., K. D. Brown, et al. (2001). "Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells." *J Exp Med* **194**(12): 1861-1874.
- Davis, R. E., V. N. Ngo, et al. (2010). "Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma." *Nature* **463**(7277): 88-92.
- Delarue, R., C. Haioun, et al. (2013). "CHOP and DHAP plus rituximab followed by autologous stem cell transplantation in mantle cell lymphoma: a phase 2 study from the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte." *Blood* **121**(1): 48-53.
- Deng, C., P. Zhang, et al. (1995). "Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control." *Cell* **82**(4): 675-684.
- Deng, J., N. Carlson, et al. (2007). "BH3 profiling identifies three distinct classes of apoptotic blocks to predict response to ABT-737 and conventional chemotherapeutic agents." *Cancer Cell* **12**(2): 171-185.
- Dreyling, M., G. Lenz, et al. (2005). "Early consolidation by myeloablative radiochemotherapy followed by autologous stem cell transplantation in first remission significantly prolongs progression-free survival in mantle-cell lymphoma: results of a prospective randomized trial of the European MCL Network." *Blood* **105**(7): 2677-2684.
- Dunleavy, K., S. Pittaluga, et al. (2009). "Differential efficacy of bortezomib plus chemotherapy within molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma." *Blood* **113**(24): 6069-6076.
- Elmore, S. (2007). "Apoptosis: a review of programmed cell death." *Toxicol Pathol* **35**(4): 495-516.
- Ewald, B., D. Sampath, et al. (2008). "Nucleoside analogs: molecular mechanisms signaling cell death." *Oncogene* **27**(50): 6522-6537.
- Ferrero, S. and M. Dreyling (2013). "The current therapeutic scenario for relapsed mantle cell lymphoma." *Curr Opin Oncol* **25**(5): 452-462.
- Fisher, R. I., E. R. Gaynor, et al. (1993). "Comparison of a standard regimen (CHOP) with three intensive chemotherapy regimens for advanced non-Hodgkin's lymphoma." *N Engl J Med* **328**(14): 1002-1006.

- Fresquet, V., M. Rieger, et al. (2014). "Acquired mutations in BCL2 family proteins conferring resistance to the BH3 mimetic ABT-199 in lymphoma." *Blood* **123**(26): 4111-4119.
- Fu, L., Y. C. Lin-Lee, et al. (2006). "Constitutive NF-kappaB and NFAT activation leads to stimulation of the BlyS survival pathway in aggressive B-cell lymphomas." *Blood* **107**(11): 4540-4548.
- Fugmann, S. D., A. I. Lee, et al. (2000). "The RAG proteins and V(D)J recombination: complexes, ends, and transposition." *Annu Rev Immunol* **18**: 495-527.
- Galmarini, C. M., J. R. Mackey, et al. (2001). "Nucleoside analogues: mechanisms of drug resistance and reversal strategies." *Leukemia* **15**(6): 875-890.
- Gascoyne, R. D., S. A. Adomat, et al. (1997). "Prognostic significance of Bcl-2 protein expression and Bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma." *Blood* **90**(1): 244-251.
- Gati, W. P., A. R. Paterson, et al. (1997). "Sensitivity of acute leukemia cells to cytarabine is a correlate of cellular es nucleoside transporter site content measured by flow cytometry with SAENTA-fluorescein." *Blood* **90**(1): 346-353.
- Gauld, S. B., J. M. Dal Porto, et al. (2002). "B cell antigen receptor signaling: roles in cell development and disease." *Science* **296**(5573): 1641-1642.
- Geisler, C. H., A. Kolstad, et al. (2008). "Long-term progression-free survival of mantle cell lymphoma after intensive front-line immunochemotherapy with in vivo-purged stem cell rescue: a nonrandomized phase 2 multicenter study by the Nordic Lymphoma Group." *Blood* **112**(7): 2687-2693.
- Gisselbrecht, C., B. Glass, et al. (2010). "Salvage regimens with autologous transplantation for relapsed large B-cell lymphoma in the rituximab era." *J Clin Oncol* **28**(27): 4184-4190.
- Goossens, T., U. Klein, et al. (1998). "Frequent occurrence of deletions and duplications during somatic hypermutation: implications for oncogene translocations and heavy chain disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(5): 2463-2468.
- Gottlieb, J. A., J. U. Gutterman, et al. (1973). "Chemotherapy of malignant lymphoma with adriamycin." *Cancer Res* **33**(11): 3024-3028.
- Goy, A., F. J. Hernandez-Ilizaliturri, et al. (2014). "A phase I/II study of the pan Bcl-2 inhibitor obatoclax mesylate plus bortezomib for relapsed or refractory mantle cell lymphoma." *Leuk Lymphoma* **55**(12): 2761-2768.
- Greiner, T. C., C. Dasgupta, et al. (2006). "Mutation and genomic deletion status of ataxia telangiectasia mutated (ATM) and p53 confer specific gene expression profiles in mantle cell lymphoma." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(7): 2352-2357.
- Hadzidimitriou, A., A. Agathangelidis, et al. (2011). "Is there a role for antigen selection in mantle cell lymphoma? Immunogenetic support from a series of 807 cases." *Blood* **118**(11): 3088-3095.
- Halldorsdottir, A. M., A. Lundin, et al. (2011). "Impact of TP53 mutation and 17p deletion in mantle cell lymphoma." *Leukemia* **25**(12): 1904-1908.
- Halldorsdottir, A. M., B. Sander, et al. (2011). "High-resolution genomic screening in mantle cell lymphoma--specific changes correlate with genomic complexity, the proliferation signature and survival." *Genes Chromosomes Cancer* **50**(2): 113-121.
- Health, U. S. N. I. o. (2016). "clinicaltrials.gov." from <https://clinicaltrials.gov/>.
- Hermine, O., C. Haioun, et al. (1996). "Prognostic significance of bcl-2 protein expression in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA)." *Blood* **87**(1): 265-272.
- Hernandez-Ilizaliturri, F. J., N. Reddy, et al. (2005). "Immunomodulatory drug CC-5013 or CC-4047 and rituximab enhance antitumor activity in a severe combined immunodeficient mouse lymphoma model." *Clin Cancer Res* **11**(16): 5984-5992.
- Hess, G., R. Herbrecht, et al. (2009). "Phase III study to evaluate temsirolimus compared with investigator's choice therapy for the treatment of relapsed or refractory mantle cell lymphoma." *J Clin Oncol* **27**(23): 3822-3829.
- Hiddemann, W., M. Kneba, et al. (2005). "Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) significantly improves

- the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group." *Blood* **106**(12): 3725-3732.
- Hiraoka, N., J. Kikuchi, et al. (2014). "Purine analog-like properties of bendamustine underlie rapid activation of DNA damage response and synergistic effects with pyrimidine analogues in lymphoid malignancies." *PLoS One* **9**(3): e90675.
- Hockenbery, D., G. Nunez, et al. (1990). "Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death." *Nature* **348**(6299): 334-336.
- Honigberg, L. A., A. M. Smith, et al. (2010). "The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(29): 13075-13080.
- Hoster, E., A. Rosenwald, et al. (2016). "Prognostic Value of Ki-67 Index, Cytology, and Growth Pattern in Mantle-Cell Lymphoma: Results From Randomized Trials of the European Mantle Cell Lymphoma Network." *J Clin Oncol* **34**(12): 1386-1394.
- Chapuy, B., H. Cheng, et al. (2016). "Diffuse large B-cell lymphoma patient-derived xenograft models capture the molecular and biological heterogeneity of the disease." *Blood* **127**(18): 2203-2213.
- Chen, R., L. Guo, et al. (2011). "Homoharringtonine reduced Mcl-1 expression and induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemia." *Blood* **117**(1): 156-164.
- Chene, P. (2003). "Inhibiting the p53-MDM2 interaction: an important target for cancer therapy." *Nat Rev Cancer* **3**(2): 102-109.
- Iqbal, J., V. T. Neppalli, et al. (2006). "BCL2 expression is a prognostic marker for the activated B-cell-like type of diffuse large B-cell lymphoma." *J Clin Oncol* **24**(6): 961-968.
- Iqbal, J., W. G. Sanger, et al. (2004). "BCL2 translocation defines a unique tumor subset within the germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma." *Am J Pathol* **165**(1): 159-166.
- Jager, U., S. Bocskor, et al. (2000). "Follicular lymphomas' BCL-2/IgH junctions contain templated nucleotide insertions: novel insights into the mechanism of t(14;18) translocation." *Blood* **95**(11): 3520-3529.
- Jardin, F., J. P. Jais, et al. (2010). "Diffuse large B-cell lymphomas with CDKN2A deletion have a distinct gene expression signature and a poor prognosis under R-CHOP treatment: a GELA study." *Blood* **116**(7): 1092-1104.
- Jost, P. J. and J. Ruland (2007). "Aberrant NF-kappaB signaling in lymphoma: mechanisms, consequences, and therapeutic implications." *Blood* **109**(7): 2700-2707.
- Katz, S. G., J. L. Labelle, et al. (2014). "Mantle cell lymphoma in cyclin D1 transgenic mice with Bim-deficient B cells." *Blood* **123**(6): 884-893.
- Kendrick, S. L., L. Redd, et al. (2014). "BCL2 antibodies targeted at different epitopes detect varying levels of protein expression and correlate with frequent gene amplification in diffuse large B-cell lymphoma." *Hum Pathol* **45**(10): 2144-2153.
- Khoury, I. F., J. Romaguera, et al. (1998). "Hyper-CVAD and high-dose methotrexate/cytarabine followed by stem-cell transplantation: an active regimen for aggressive mantle-cell lymphoma." *J Clin Oncol* **16**(12): 3803-3809.
- Khoury, J. D., L. J. Medeiros, et al. (2003). "Expression of Mcl-1 in mantle cell lymphoma is associated with high-grade morphology, a high proliferative state, and p53 overexpression." *J Pathol* **199**(1): 90-97.
- Kienle, D., A. Krober, et al. (2003). "VH mutation status and VDJ rearrangement structure in mantle cell lymphoma: correlation with genomic aberrations, clinical characteristics, and outcome." *Blood* **102**(8): 3003-3009.
- Klanova, M., T. Soukup, et al. (2014). "Mouse models of mantle cell lymphoma, complex changes in gene expression and phenotype of engrafted MCL cells: implications for preclinical research." *Lab Invest* **94**(7): 806-817.
- Klener, P. (2013). *Principy systémové protinádorové léčby*. Praha, Grada publishing.

- Korsmeyer, S. J., M. C. Wei, et al. (2000). "Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c." *Cell Death Differ* **7**(12): 1166-1173.
- Kuwana, T., L. Bouchier-Hayes, et al. (2005). "BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly." *Mol Cell* **17**(4): 525-535.
- Lam, L. T., R. E. Davis, et al. (2005). "Small molecule inhibitors of I κ B kinase are selectively toxic for subgroups of diffuse large B-cell lymphoma defined by gene expression profiling." *Clin Cancer Res* **11**(1): 28-40.
- Lamba, J. K. (2009). "Genetic factors influencing cytarabine therapy." *Pharmacogenomics* **10**(10): 1657-1674.
- Lannutti, B. J., S. A. Meadows, et al. (2011). "CAL-101, a p110 δ selective phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor for the treatment of B-cell malignancies, inhibits PI3K signaling and cellular viability." *Blood* **117**(2): 591-594.
- Laurell, A., A. Kolstad, et al. (2014). "High dose cytarabine with rituximab is not enough in first-line treatment of mantle cell lymphoma with high proliferation: early closure of the Nordic Lymphoma Group Mantle Cell Lymphoma 5 trial." *Leuk Lymphoma* **55**(5): 1206-1208.
- LeBien, T. W. and T. F. Tedder (2008). "B lymphocytes: how they develop and function." *Blood* **112**(5): 1570-1580.
- Lefrere, F., A. Delmer, et al. (2002). "Sequential chemotherapy by CHOP and DHAP regimens followed by high-dose therapy with stem cell transplantation induces a high rate of complete response and improves event-free survival in mantle cell lymphoma: a prospective study." *Leukemia* **16**(4): 587-593.
- Lenz, G., R. E. Davis, et al. (2008). "Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma." *Science* **319**(5870): 1676-1679.
- Lenz, G., I. Nagel, et al. (2007). "Aberrant immunoglobulin class switch recombination and switch translocations in activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma." *J Exp Med* **204**(3): 633-643.
- Lenz, G., G. W. Wright, et al. (2008). "Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(36): 13520-13525.
- Letai, A., M. C. Bassik, et al. (2002). "Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics." *Cancer Cell* **2**(3): 183-192.
- Li, L., P. Pongtornpipat, et al. (2015). "Synergistic induction of apoptosis in high-risk DLBCL by BCL2 inhibition with ABT-199 combined with pharmacologic loss of MCL1." *Leukemia*.
- Lindqvist, L. M., I. Vikstrom, et al. (2012). "Translation inhibitors induce cell death by multiple mechanisms and Mcl-1 reduction is only a minor contributor." *Cell Death Dis* **3**: e409.
- Lindsten, T., A. J. Ross, et al. (2000). "The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues." *Mol Cell* **6**(6): 1389-1399.
- Liu, Z., C. Sun, et al. (2000). "Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain." *Nature* **408**(6815): 1004-1008.
- Lohr, J. G., P. Stojanov, et al. (2012). "Discovery and prioritization of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by whole-exome sequencing." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(10): 3879-3884.
- Lovec, H., A. Grzeschiczek, et al. (1994). "Cyclin D1/bcl-1 cooperates with myc genes in the generation of B-cell lymphoma in transgenic mice." *EMBO J* **13**(15): 3487-3495.
- Ma, H., T. M. Yankee, et al. (2001). "Visualization of Syk-antigen receptor interactions using green fluorescent protein: differential roles for Syk and Lyn in the regulation of receptor capping and internalization." *J Immunol* **166**(3): 1507-1516.
- Ma, X. M. and J. Blenis (2009). "Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control." *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(5): 307-318.

- Maloney, D. G., T. M. Liles, et al. (1994). "Phase I clinical trial using escalating single-dose infusion of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8) in patients with recurrent B-cell lymphoma." *Blood* **84**(8): 2457-2466.
- Mani, R., C. L. Chiang, et al. (2015). "ROR1-targeted delivery of OSU-2S, a nonimmunosuppressive FTY720 derivative, exerts potent cytotoxicity in mantle-cell lymphoma in vitro and in vivo." *Exp Hematol* **43**(9): 770-774 e772.
- Martinez, N., F. I. Camacho, et al. (2003). "The molecular signature of mantle cell lymphoma reveals multiple signals favoring cell survival." *Cancer Res* **63**(23): 8226-8232.
- Mayo, L. D. and D. B. Donner (2001). "A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(20): 11598-11603.
- McDonnell, T. J., N. Deane, et al. (1989). "bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation." *Cell* **57**(1): 79-88.
- Mestre-Escorihuela, C., F. Rubio-Moscardo, et al. (2007). "Homozygous deletions localize novel tumor suppressor genes in B-cell lymphomas." *Blood* **109**(1): 271-280.
- Morin, R. D., M. Mendez-Lago, et al. (2011). "Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma." *Nature* **476**(7360): 298-303.
- Muramatsu, M., K. Kinoshita, et al. (2000). "Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme." *Cell* **102**(5): 553-563.
- Nakano, K. and K. H. Vousden (2001). "PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53." *Mol Cell* **7**(3): 683-694.
- Navarro, A., S. Bea, et al. (2009). "MicroRNA expression, chromosomal alterations, and immunoglobulin variable heavy chain hypermutations in Mantle cell lymphomas." *Cancer Res* **69**(17): 7071-7078.
- Ngo, V. N., R. E. Davis, et al. (2006). "A loss-of-function RNA interference screen for molecular targets in cancer." *Nature* **441**(7089): 106-110.
- Ngo, V. N., R. M. Young, et al. (2011). "Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma." *Nature* **470**(7332): 115-119.
- Nguyen, M., R. C. Marcellus, et al. (2007). "Small molecule obatoclax (GX15-070) antagonizes MCL-1 and overcomes MCL-1-mediated resistance to apoptosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(49): 19512-19517.
- Nogai, H., B. Dorken, et al. (2011). "Pathogenesis of non-Hodgkin's lymphoma." *J Clin Oncol* **29**(14): 1803-1811.
- Oda, E., R. Ohki, et al. (2000). "Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis." *Science* **288**(5468): 1053-1058.
- Oellerich, T., V. Bremes, et al. (2011). "The B-cell antigen receptor signals through a preformed transducer module of SLP65 and CIN85." *EMBO J* **30**(17): 3620-3634.
- Oliner, J. D., J. A. Pietenpol, et al. (1993). "Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53." *Nature* **362**(6423): 857-860.
- Olivier, M., M. Hollstein, et al. (2010). "TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**(1): a001008.
- Pasqualucci, L., A. Migliazza, et al. (2003). "Mutations of the BCL6 proto-oncogene disrupt its negative autoregulation in diffuse large B-cell lymphoma." *Blood* **101**(8): 2914-2923.
- Pasqualucci, L., A. Migliazza, et al. (1998). "BCL-6 mutations in normal germinal center B cells: evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(20): 11816-11821.
- Pasqualucci, L., P. Neumeister, et al. (2001). "Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas." *Nature* **412**(6844): 341-346.
- Pasqualucci, L., V. Trifonov, et al. (2011). "Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma." *Nat Genet* **43**(9): 830-837.

- Peled, J. U., F. L. Kuang, et al. (2008). "The biochemistry of somatic hypermutation." *Annu Rev Immunol* **26**: 481-511.
- Pfeifer, M., M. Grau, et al. (2013). "PTEN loss defines a PI3K/AKT pathway-dependent germinal center subtype of diffuse large B-cell lymphoma." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(30): 12420-12425.
- Pinyol, M., L. Hernandez, et al. (1997). "Deletions and loss of expression of p16INK4a and p21Waf1 genes are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas." *Blood* **89**(1): 272-280.
- Prasad, A., A. Shrivastava, et al. (2013). "Combined administration of rituximab and on 013105 induces apoptosis in mantle cell lymphoma cells and reduces tumor burden in a mouse model of mantle cell lymphoma." *Clin Cancer Res* **19**(1): 85-95.
- Psyrrri, A., S. Papageorgiou, et al. (2009). "Phosphatidylinositol 3'-kinase catalytic subunit alpha gene amplification contributes to the pathogenesis of mantle cell lymphoma." *Clin Cancer Res* **15**(18): 5724-5732.
- Puthalakath, H., D. C. Huang, et al. (1999). "The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex." *Mol Cell* **3**(3): 287-296.
- Raghavan, S. C., P. C. Swanson, et al. (2004). "A non-B-DNA structure at the Bcl-2 major breakpoint region is cleaved by the RAG complex." *Nature* **428**(6978): 88-93.
- Rao, P. H., J. Houldsworth, et al. (1998). "Chromosomal and gene amplification in diffuse large B-cell lymphoma." *Blood* **92**(1): 234-240.
- Rawlings, D. J., K. Sommer, et al. (2006). "The CARMA1 signalosome links the signalling machinery of adaptive and innate immunity in lymphocytes." *Nat Rev Immunol* **6**(11): 799-812.
- Rizzatti, E. G., R. P. Falcao, et al. (2005). "Gene expression profiling of mantle cell lymphoma cells reveals aberrant expression of genes from the PI3K-AKT, WNT and TGFbeta signalling pathways." *Br J Haematol* **130**(4): 516-526.
- Romaguera, J. E., L. Fayad, et al. (2005). "High rate of durable remissions after treatment of newly diagnosed aggressive mantle-cell lymphoma with rituximab plus hyper-CVAD alternating with rituximab plus high-dose methotrexate and cytarabine." *J Clin Oncol* **23**(28): 7013-7023.
- Romaguera, J. E., L. E. Fayad, et al. (2010). "Phase I trial of bortezomib in combination with rituximab-HyperCVAD alternating with rituximab, methotrexate and cytarabine for untreated aggressive mantle cell lymphoma." *Br J Haematol* **151**(1): 47-53.
- Romashkova, J. A. and S. S. Makarov (1999). "NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling." *Nature* **401**(6748): 86-90.
- Rosenwald, A., G. Wright, et al. (2002). "The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma." *N Engl J Med* **346**(25): 1937-1947.
- Rosenwald, A., G. Wright, et al. (2003). "The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma." *Cancer Cell* **3**(2): 185-197.
- Roussel, M. F. (1999). "The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer." *Oncogene* **18**(38): 5311-5317.
- Ruan, J., P. Martin, et al. (2011). "Bortezomib plus CHOP-rituximab for previously untreated diffuse large B-cell lymphoma and mantle cell lymphoma." *J Clin Oncol* **29**(6): 690-697.
- Ryan, J. A., J. K. Brunelle, et al. (2010). "Heightened mitochondrial priming is the basis for apoptotic hypersensitivity of CD4+ CD8+ thymocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(29): 12895-12900.
- Saito, M., U. Novak, et al. (2009). "BCL6 suppression of BCL2 via Miz1 and its disruption in diffuse large B cell lymphoma." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(27): 11294-11299.
- Saleh, A., S. M. Srinivasula, et al. (1999). "Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation." *J Biol Chem* **274**(25): 17941-17945.
- Sanchez-Beato, M., A. Sanchez-Aguilera, et al. (2003). "Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas." *Blood* **101**(4): 1220-1235.
- Scott, D. W. and R. D. Gascoyne (2014). "The tumour microenvironment in B cell lymphomas." *Nat Rev Cancer* **14**(8): 517-534.

- Scott, D. W., G. W. Wright, et al. (2014). "Determining cell-of-origin subtypes of diffuse large B-cell lymphoma using gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissue." *Blood* **123**(8): 1214-1217.
- Scott, F. L., J. B. Denault, et al. (2005). "XIAP inhibits caspase-3 and -7 using two binding sites: evolutionarily conserved mechanism of IAPs." *EMBO J* **24**(3): 645-655.
- Sehn, L. H., J. Donaldson, et al. (2005). "Introduction of combined CHOP plus rituximab therapy dramatically improved outcome of diffuse large B-cell lymphoma in British Columbia." *J Clin Oncol* **23**(22): 5027-5033.
- Seymour, J. F., J. F. Gerecitano, et al. (2013). The Single-Agent Bcl-2 Inhibitor ABT-199 (GDC-0199) In Patients With Relapsed/Refractory (R/R) Non-Hodgkin Lymphoma (NHL): Responses Observed In All Mantle Cell Lymphoma (MCL) Patients.
- Sherr, C. J. (2000). "The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited." *Cancer Res* **60**(14): 3689-3695.
- Schatz, D. G., M. A. Oettinger, et al. (1989). "The V(D)J recombination activating gene, RAG-1." *Cell* **59**(6): 1035-1048.
- Schile, A. J., M. Garcia-Fernandez, et al. (2008). "Regulation of apoptosis by XIAP ubiquitin-ligase activity." *Genes Dev* **22**(16): 2256-2266.
- Schuetz, J. M., N. A. Johnson, et al. (2012). "BCL2 mutations in diffuse large B-cell lymphoma." *Leukemia* **26**(6): 1383-1390.
- Song, J. H., S. H. Kim, et al. (2009). "Defective expression of deoxycytidine kinase in cytarabine-resistant acute myeloid leukemia cells." *Int J Oncol* **34**(4): 1165-1171.
- Souers, A. J., J. D. Levenson, et al. (2013). "ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets." *Nat Med* **19**(2): 202-208.
- Srinivasan, L., Y. Sasaki, et al. (2009). "PI3 kinase signals BCR-dependent mature B cell survival." *Cell* **139**(3): 573-586.
- Strauss, S. J., K. Higginbottom, et al. (2007). "The proteasome inhibitor bortezomib acts independently of p53 and induces cell death via apoptosis and mitotic catastrophe in B-cell lymphoma cell lines." *Cancer Res* **67**(6): 2783-2790.
- Tait, S. W. and D. R. Green (2010). "Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond." *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(9): 621-632.
- Takuwa, N., Y. Fukui, et al. (1999). "Cyclin D1 expression mediated by phosphatidylinositol 3-kinase through mTOR-p70(S6K)-independent signaling in growth factor-stimulated NIH 3T3 fibroblasts." *Mol Cell Biol* **19**(2): 1346-1358.
- Talos, F., O. Petrenko, et al. (2005). "Mitochondrially targeted p53 has tumor suppressor activities in vivo." *Cancer Res* **65**(21): 9971-9981.
- Townsend, E. C., M. A. Murakami, et al. (2016). "The Public Repository of Xenografts Enables Discovery and Randomized Phase II-like Trials in Mice." *Cancer Cell* **30**(1): 183.
- Tsai, A. G., H. Lu, et al. (2008). "Human chromosomal translocations at CpG sites and a theoretical basis for their lineage and stage specificity." *Cell* **135**(6): 1130-1142.
- Visco, C., S. Castegnaro, et al. (2012). "The cytotoxic effects of bendamustine in combination with cytarabine in mantle cell lymphoma cell lines." *Blood Cells Mol Dis* **48**(1): 68-75.
- Visco, C., S. Finotto, et al. (2013). "Combination of rituximab, bendamustine, and cytarabine for patients with mantle-cell non-Hodgkin lymphoma ineligible for intensive regimens or autologous transplantation." *J Clin Oncol* **31**(11): 1442-1449.
- Vivanco, I. and C. L. Sawyers (2002). "The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer." *Nat Rev Cancer* **2**(7): 489-501.
- Wang, M. L., S. Rule, et al. (2013). "Targeting BTK with ibrutinib in relapsed or refractory mantle-cell lymphoma." *N Engl J Med* **369**(6): 507-516.
- Wei, M. C., T. Lindsten, et al. (2000). "tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c." *Genes Dev* **14**(16): 2060-2071.
- Wenzel, S. S., M. Grau, et al. (2013). "MCL1 is deregulated in subgroups of diffuse large B-cell lymphoma." *Leukemia* **27**(6): 1381-1390.

- Willis, T. G. and M. J. Dyer (2000). "The role of immunoglobulin translocations in the pathogenesis of B-cell malignancies." *Blood* **96**(3): 808-822.
- Winer, E. S., R. R. Ingham, et al. (2012). "PCI-32765: a novel Bruton's tyrosine kinase inhibitor for the treatment of lymphoid malignancies." *Expert Opin Investig Drugs* **21**(3): 355-361.
- Xu-Monette, Z. Y., L. J. Medeiros, et al. (2012). "Dysfunction of the TP53 tumor suppressor gene in lymphoid malignancies." *Blood* **119**(16): 3668-3683.
- Xu-Monette, Z. Y., L. Wu, et al. (2012). "Mutational profile and prognostic significance of TP53 in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP: report from an International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study." *Blood* **120**(19): 3986-3996.
- Yi, S., D. Zou, et al. (2015). "High incidence of MYC and BCL2 abnormalities in mantle cell lymphoma, although only MYC abnormality predicts poor survival." *Oncotarget*.
- Young, R. M. and L. M. Staudt (2013). "Targeting pathological B cell receptor signalling in lymphoid malignancies." *Nat Rev Drug Discov* **12**(3): 229-243.
- Zha, J., H. Harada, et al. (1996). "Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L)." *Cell* **87**(4): 619-628.
- Zhang, J., D. Jima, et al. (2014). "The genomic landscape of mantle cell lymphoma is related to the epigenetically determined chromatin state of normal B cells." *Blood* **123**(19): 2988-2996.