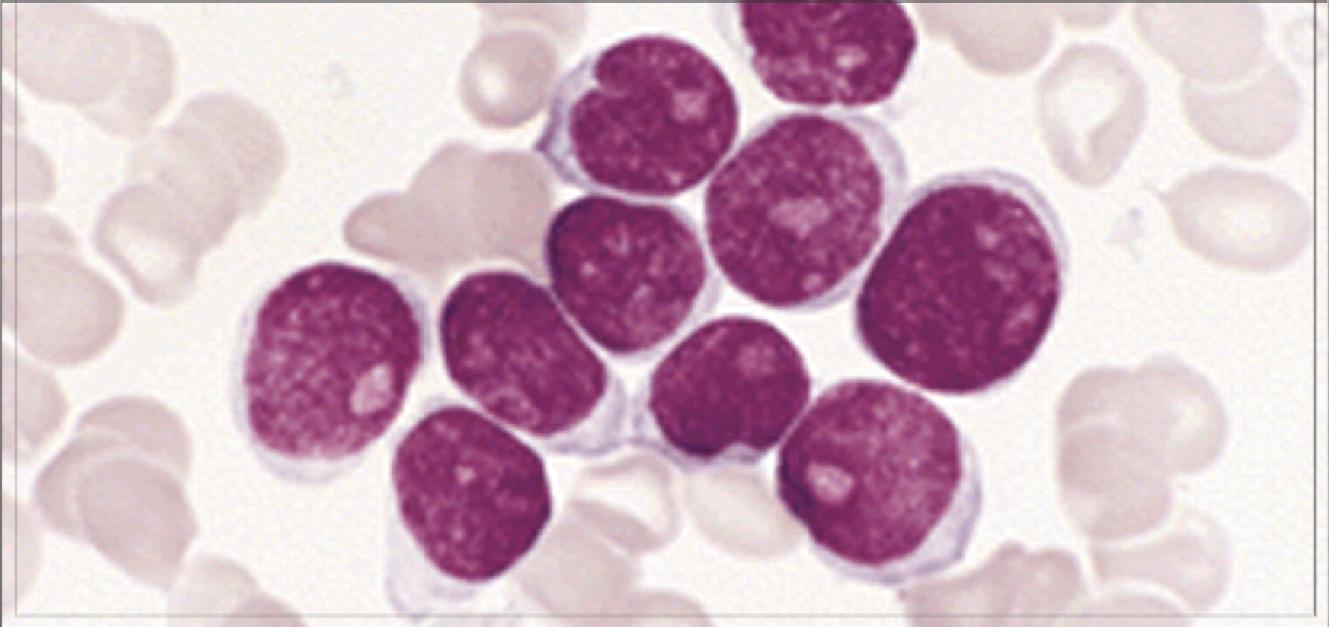
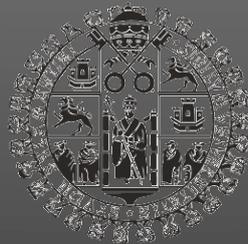


**NUEVAS ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS EN LEUCEMIAS
AGUDAS MIELOBLÁSTICAS: EVALUACIÓN PRECLÍNICA
DE LA EFICACIA Y EL MECANISMO DE ACIÓN**



Tesis Doctoral



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

Departamento de Medicina

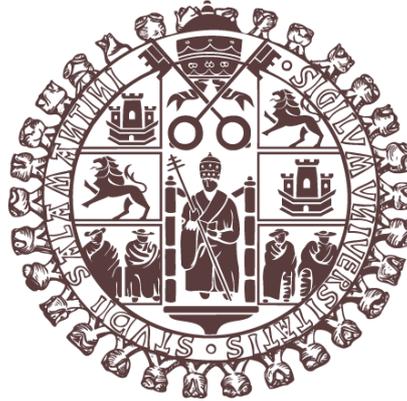
Enrique Colado Varela

2010

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

HEMATOLOGÍA



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

TESIS DOCTORAL

**NUEVAS ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS EN
LEUCEMIAS AGUDAS MIELOBLÁSTICAS:
EVALUACIÓN PRECLÍNICA DE EFICACIA Y
MECANISMO DE ACIÓN.**

Enrique Colado Varela

2010

D. Jesús San Miguel Izquierdo, Catedrático de Hematología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca y Jefe del Servicio de Hematología del Hospital Clínico Universitario de Salamanca.

D. Atanasio Pandiella Alonso, Doctor en Medicina. Investigador Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

D. Patricia Maiso Castellanos, Doctora en Biología.

CERTIFICAN:

Que el trabajo realizado bajo nuestra dirección por D. Enrique Colado titulado “nuevas estrategias terapéuticas en leucemias agudas mieloblásticas: Evaluación preclínica de eficacia y mecanismo de acción”, reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firmamos la siguiente certificación en Salamanca, a veintiocho de Junio de dos mil diez.

Prof. Jesús F. San Miguel Izquierdo

Dr. Atanasio Pandiella Alonso

Dra. Patricia Maiso Castellanos

ABREVIATURAS

AIF	<i>Apoptosis-inducing factor.</i>
Akt	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene.</i>
Apaf-1	<i>Apoptotic Protease Activating Factor-1.</i>
AV	<i>Annexin V.</i>
Bad	<i>Bcl-2-Antagonist of Cell Death.</i>
Bak	<i>Bcl2 Antagonist Killer.</i>
Bax	<i>Bcl2 Associated-X Protein.</i>
Bcl-xL	<i>Bcl-2 Related Protein Long Isoform.</i>
Bcl-2	<i>B-Cell CLL/Lymphoma-2.</i>
BER	<i>Base-excision repair.</i>
Bid	<i>BH3 Interacting Domain Death Agonist.</i>
Bim	<i>Bcl2-Interacting Protein BIM.</i>
Bnip3	<i>Bcl2adenovirus E1B 19kDa-interacting protein 1 NIP3.</i>
BRCA1	<i>Breast Cancer, Early onset 1.</i>
BRCA2	<i>Breast Cancer, Early onset 2.</i>
Caspases	<i>Cysteine Aspartate-specific Proteases.</i>
CCN	<i>Ciclina.</i>
CDKs	<i>Cyclin-Dependent Kinases.</i>
C-myc	<i>v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog.</i>
CN	<i>Cariotipo Normal.</i>
CXCL12	<i>Chemokine (C-X-C motif) Ligand 12.</i>
CXCR4	<i>Chemokine (C-X-C motif) Receptor 4.</i>
DED	<i>Death Effector Domain.</i>
DDR	<i>DNA Damage Response.</i>

Diablo	<i>Direct IAP Binding protein with Low pI.</i>
DISC	<i>Death-Inducing Signalling Complex.</i>
DSB	<i>Double Strand break.</i>
EndoG	<i>Endonuclease G.</i>
EMR	<i>Enfermedad Mínima Residual.</i>
Erk 1/2	<i>Extracellular Signal Regulated Kinase-1/2.</i>
FADD	<i>Fas Associated Death Domain.</i>
FGFR1	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor-1.</i>
FLIP	<i>FLICE Inhibitory Protein.</i>
FLT-3	<i>fms-like Tyrosine Kinase 3.</i>
GADD45	<i>DNA Damage-Inducible Gene-GADD45.</i>
HATs	<i>Histone Acetyl Transferases.</i>
HDACs	<i>Histone Deacetylases.</i>
HSPs	<i>Heat shock proteins.</i>
HR	<i>Homologous recombination.</i>
IAPs	<i>Inhibitor of Apoptosis Proteins.</i>
IκB	<i>Inhibitor of kappaB kinase.</i>
IMiDs	<i>Immunomodulatory drugs.</i>
ITD	<i>Internal Tandem Duplication.</i>
JAK	<i>Janus Kinase.</i>
KIP	<i>Kinase Inhibitor Protein.</i>
LAM	<i>Leucemia Aguda Mieloblástica.</i>
LM	<i>Length Mutation.</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase.</i>
Mcl-1	<i>Myeloid Cell Leukemia-1.</i>

Mdm-2	<i>Mouse Double Minute-2.</i>
MMP-9	<i>Matrix Metalloproteinase-9.</i>
MMSET	<i>Multiple Myeloma SET domain protein.</i>
MRN	<i>Complejo formado por MRE-11, Rad 50 y Nibrin (NSB).</i>
MTT	<i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide.</i>
MUC-1	<i>Mucin-1-Transmembrane.</i>
NER	<i>Nucleotide excision repair.</i>
NF-κB	<i>Nuclear Factor-Kappa B.</i>
NHEJ	<i>Non-Homologous End Joining.</i>
NK	<i>Natural Killer.</i>
NPM1	<i>Nucleophosmin.</i>
PARP	<i>Poly (ADP-Ribose) Polymerase.</i>
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen.</i>
PI3K	<i>Phosphatidyl Inositol-3 kinase.</i>
PKC	<i>Protein Kinase-C.</i>
Raf	<i>v-raf-1 murine leukemia viral oncogene.</i>
Ras	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene.</i>
Rb	<i>Retinoblastoma.</i>
RC	<i>Remisión Completa.</i>
RCp	<i>Remisión Completa sin recuperación de la trombopenia.</i>
RP	<i>Respuesta Parcial.</i>
SDF-1α	<i>Stromal Cell Derived Factor-1.</i>
Smac	<i>Second Mitochondria-derived Activator of Caspase.</i>
SSB	<i>Single strand break.</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription.</i>

TNF	<i>Tumor Necrosis Factor.</i>
TNF-R	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor.</i>
TRADD	<i>TNFR-associated death domain protein.</i>
TRAIL	<i>TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand.</i>
TRAIL-R	<i>TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor.</i>
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1.</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor.</i>
XIAPs	<i>X-linked Inhibitor of Apoptosis Proteins.</i>

A Virginia

Al Profesor Jesús San Miguel, por compartir su visión y experiencia para ayudarme a recorrer el camino que ahora sé que es el correcto. Por entregarme una filosofía de trabajo que siempre llevaré conmigo. Por su constatación e inestimable apoyo, entusiasmo y paciencia en esta tesis.

Al Profesor Atanasio Pandiella, por prestarme su valioso tiempo y su generosa ayuda. Por sus momentos de reflexión compartida, gracias a los cuales amplía nuestro punto de vista y sin los cuales no podría haber llevado a cabo este trabajo. Por su serenidad y cariño a lo largo de estos años.

A la Dra. Patricia Maiso, por su constancia, comprensión y discusión constructiva a lo largo de todos estos años.

A todas las personas con las que he tenido el privilegio de trabajar, a todos los compañeros del Hospital Universitario de Salamanca y del Centro de Investigación del Cáncer, de todos vosotros he aprendido algo valioso.

A Jesús Martín, por ser el mejor compañero que he tenido en toda mi vida laboral. A Cristina, Teresa, Nacho, Olga, Ernesto, Juan y un largo etcétera de compañeros que han compartido fatigas e ilusiones a partes iguales.

A la sección de Inmunopatología del Laboratorio de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca: Belén, Chelo, Jose y Bruno por hacerme descubrir un mundo. A Gloria, Isabel y Maite por darme siempre un poco más de muestra.

Al Servicio General de Citometría de la Universidad de Salamanca, por la imaginación y rigurosidad que espero llevarme conmigo.

A Lourdes, Chelo, Mariví y Lola, por enseñarme lo que realmente significa la clínica.

A Jesús Mari y Norma, por hacerme ver más allá de lo evidente.

A Jose Antonio y Nacho, porque un día recogieron mis pedazos e hicieron un espejo en el que mirarme.

A todo el grupo del laboratorio 12 del CIC, especialmente a Eva y a Ana, por hacerme ir cada día a trabajar con una sonrisa.

A todos los miembros del laboratorio 15 del CIC, por ese maravilloso trasvase de conocimiento.

A Enrique Ocio, por estar dispuesto a enseñarme, aconsejarme y corregirme desde el primer día que nos conocimos.

A Xonia Carbajal, por ser la mejor profesora de técnicas que siempre he tenido.

A Edu, Gus y Eva, porque aunque hayamos tomado caminos distintos, compartimos la misma pasión por la medicina y recuerdos imperecederos.

A Carlos, por su ayuda desinteresada y sincera desde hace tantos años.

A mi hermana, porque una única vida difícil ya es suficiente.

A mi madre, por enseñarme el verdadero valor del sacrificio.

A Virginia, porque dejó una vida para venir a mi lado, por comprender mejor que yo mismo lo que significa mi trabajo y estar a mi lado incondicionalmente. Porque sin ella, nada sería lo mismo.

A los miembros del Tribunal, por acceder amablemente a formar parte del mismo.

A todos los pacientes, porque realmente ellos son quienes deben de juzgar nuestros logros.

You lay there [...]
Like broken glass reflecting pieces of the sun
But you're not the flame

Índice

Índice	1
Introducción	3
Mecanismos de leucemogénesis	7
<i>Modelos de estudio de las leucemias mieloblásticas</i>	9
<i>Citogenética</i>	12
<i>Ganancias y pérdidas cromosómicas</i>	12
<i>Alteraciones estructurales recurrentes</i>	13
<i>Biología Molecular</i>	17
<i>Alteraciones en receptores transmembrana</i>	17
<i>Alteraciones en diferenciación</i>	20
<i>Vías de señalización intracelular</i>	23
<i>Epigenética</i>	28
<i>Metilación del ADN</i>	29
<i>Modificaciones de Histonas</i>	29
<i>ARN no codificante</i>	30
<i>Interacciones de la célula blástica con el estroma</i>	31
<i>Ciclo celular</i>	32
<i>Base molecular del ciclo: CDKs y Ciclinas</i>	33
<i>Complejos CDK-ciclinas</i>	34
<i>Inhibidores de CDKs</i>	36
<i>p53</i>	38
<i>Mecanismos de muerte celular</i>	41
<i>Vía extrínseca: Receptores de muerte</i>	44
<i>Caspasas</i>	47
<i>Vía intrínseca: La mitocondria</i>	50
<i>Daño y reparación del ADN</i>	56
<i>Mecanismos de reparación del daño al DNA</i>	56
<i>Daño al ADN en leucemias agudas mieloblásticas</i>	64

<i>Mecanismos generales de resistencia a drogas</i>	65
<i>Alteraciones en el transporte transmembrana</i>	66
<i>Lesiones genéticas</i>	67
<i>Reparación de ADN</i>	67
<i>Metabolismo de los fármacos</i>	68
<i>Tratamiento de las leucemias agudas mieloblásticas</i>	69
<i>Tratamiento en pacientes jóvenes</i>	70
<i>Tratamiento en pacientes mayores</i>	71
<i>Nuevos fármacos en LAM</i>	72
Hipótesis y Objetivos	78
Material y Métodos	81
1- <i>Líneas celulares</i>	82
2- <i>Células procedentes de pacientes</i>	83
3- <i>Medida de la viabilidad y proliferación celular</i>	83
3.1. <i>MTT</i>	83
4- <i>Estudio de apoptosis por Citometría de Flujo Multiparamétrica</i>	85
4.1. <i>Anexina V-Ioduro de Propidio. Estudio en líneas celulares.</i>	85
4. 2. <i>Estudios exvivo.</i>	87
5- <i>Potencial de membrana mitocondrial</i>	91
6- <i>Fragmentación de ADN en geles de agarosa.</i>	92
7- <i>Estudio del ciclo celular</i>	93
8- <i>Microarrays de RNA</i>	96
9- <i>Western Blot.</i>	103
CAPÍTULO 1: Bortezomib en LAM	109
CAPÍTULO 2: Panobinostat y Doxorubicina en LAM	123
CAPÍTULO 3: Zalypsis en LAM	136
Discusión	164
Conclusiones	175
Bibliografía	178

Introducción

Las leucemias agudas mieloblásticas (LAM) son un conjunto heterogéneo de enfermedades clonales originadas por un daño genético adquirido en una célula madre hemopoyética, la cual pierde los mecanismos para diferenciarse normalmente y responder a los mecanismos reguladores de la proliferación.^{1, 2} Esta pérdida provoca un acumulo de formas inmaduras (blastos) en la médula ósea, desplazando la hemopoyesis normal, provocando insuficiencia medular, y otros tejidos, provocando manifestaciones extramedulares (por ejemplo, las leucémides o leucostasis)

Las Leucemias Agudas Mieloblásticas son las Leucemias Agudas más frecuentes en los adultos, con una prevalencia de 3,8 casos/10⁵ habitantes al año. La incidencia de las LAM aumenta con la edad, alcanzando hasta incluso 17-20 casos/10⁵ habitantes al año en pacientes mayores de 65 años.³ La edad media de la presentación es 70 años, y existe un predominio masculino, con 3 varones afectados por cada 2 mujeres.

El curso clínico de las LAM suele ser brusco, con un intervalo de escasos días o semanas entre los primeros síntomas y el diagnóstico, aunque, ocasionalmente, puede ser diagnosticada en un examen rutinario en un paciente asintomático.

Desde que se identificaron como una entidad patológica hasta mediados del siglo XX, leucemias agudas mieloblásticas eran consideradas enfermedades incurables, con resultados desesperanzadores con las terapias disponibles, con las cuales pocos pacientes alcanzaban remisiones completas y la supervivencia muy corta.⁴ La obtención de la Remisión Completa es el primer objetivo del tratamiento de una Leucemia Aguda Mieloblástica (Inducción a la remisión) ya

que es la condición *sine qua non* para la curación de la enfermedad.⁵ La Remisión Completa es la situación en la cual no existe evidencia ni clínica ni morfológica de la enfermedad, con parámetros hemoperiféricos normales.⁶ Durante los últimos 35 años una serie de ensayos han establecido el tratamiento de los pacientes afectos de LAM, ⁷ que consiste en una combinación de citarabina en infusión continua durante 7 días y una antraciclina (Daunorrubicina o Idarrubicina) durante 3 días (Régimen 3+7),^{8,9} con el que un 60-80% de los pacientes alcanzan una remisión completa, con una supervivencia a largo plazo en torno al 40%.^{1,10,11} Otras alternativas como dosis altas de antraciclinas o citarabina,^{12,13} o adición de un tercer fármaco (análogos de purinas, inhibidores de topoisomerasas, inhibidores de la bomba de MDR,...) no han confirmado sus teóricas ventajas sobre el tratamiento estandar.⁷ Sin embargo, la obtención de una remisión completa no equivale a la curación de la enfermedad, ya que, sin tratamiento posterior, la mayoría de los pacientes experimentarán una recaída de su enfermedad en semanas o meses. Estos tratamientos adicionales incluyen la quimioterapia de consolidación (o intensificación)¹⁴⁻¹⁷, tratamientos de mantenimiento^{8, 18} o trasplante de células hemopoyéticas, tanto autólogo,^{19, 20} como alogénico.²¹⁻²⁵ Sin tratamiento intensivo, y a pesar de los progresos en el soporte transfusional y el tratamiento anti-infeccioso, la mitad de los pacientes fallecen antes de 1,5 meses tras el diagnóstico y prácticamente ninguno alcanza el año de supervivencia.²⁶

Las recaídas clínicas son debidas a la presencia de Enfermedad Mínima Residual (EMR) en el paciente que no ha podido ser erradicada con el tratamiento de primera línea, la importancia de la evaluación de la EMR es capital ya que aporta un valor pronóstico independiente tanto al finalizar la inducción como al

finalizar el tratamiento de consolidación,²⁷⁻³⁰ y permite el uso de estrategias adaptadas al riesgo del paciente.²⁷

Mecanismos de leucemogénesis

La transformación maligna implica la adquisición de una serie de eventos genéticos y epigenéticos que alteran los programas de desarrollo normal dando lugar a un clon neoplásico con desregulación de los mecanismos de crecimiento y de muerte celular.²⁸ Las leucemias agudas mieloblásticas son un conjunto heterogéneo de enfermedades ya que cada una está producida por un conjunto de cambios genéticos y epigenéticos. La capacidad de comprender este proceso requiere la caracterización de tanto los eventos moleculares que provocan el crecimiento tumoral así como el contexto celular en el que estas alteraciones genéticas ocurren. A mediados del siglo XX, los mecanismos implicados en la regulación de la proliferación, diferenciación, maduración o activación de las células hemopoyéticas eran prácticamente desconocidos.²⁹ En ese momento, dado que la única herramienta era el microscopio y células blásticas tenían un aspecto inmaduro se pensó que el problema fundamental era el déficit de maduración. A lo largo de los últimos 20 años, esta situación se ha ido cambiando progresivamente gracias al descubrimiento de genes que controlan las decisiones de proliferación a través del control del ciclo celular junto con otros responsables de los mecanismos implicados en la maduración celular.^{29,30}

La hematopoyesis normal es un proceso dinámico regulado y controlado por los efectos combinados de los factores de crecimiento (citocinas hematopoyéticas) y los factores de transcripción que activan programas genéticos que llevan a la célula a comprometerse a un linaje específico y a la diferenciación final.^{31,32}

La leucemogénesis implica la adquisición de una serie de alteraciones que convierten a una célula madre hemopoyética u otro progenitor hematopoyético multipotente en una célula madre leucémica capaz de propagar y mantener la

enfermedad. El programa génico leucémico está caracterizado por parada en los mecanismos de diferenciación, aumento de proliferación y autorenovación, disminución de apoptosis y mantenimiento de telómeros.³³ A nivel básico, parecen ser necesarias al menos dos mutaciones, una que confiera ventaja proliferativa y otra que altere la diferenciación, aunque otros cambios genéticos y epigenéticos son necesarios.^{30,34,35}

Modelos de estudio de las leucemias mieloblásticas

Las aproximaciones para entender estos cambios vienen dadas principalmente por nuestra capacidad de identificar y caracterizar las translocaciones cromosómicas y otras alteraciones genéticas/epigenéticas en las células blásticas. Las translocaciones cromosómicas en LAM suelen ser balanceadas, sugiriendo un papel causal en la leucemogénesis.³⁶ El estudio riguroso ha llevado al conocimiento de al menos 250 genes de fusión como mecanismos causales de hemopatías malignas, así como otras alteraciones genéticas recurrentes como mutaciones de NPM1 o de FLT3.³⁷⁻⁴⁰ Este conocimiento ha posibilitado el diseño de nuevas terapias dirigidas frente a dianas moleculares.⁴¹⁻⁴³ Para llegar a este conocimiento, se han usado una serie de modelos de estudio de las LAM, que pasamos a relatar brevemente.

Líneas celulares

Las células hemopoyéticas normales solo pueden sobrevivir en cultivo unas semanas, en cambio, las líneas celulares son poblaciones monoclonales inmortalizadas que son capaces de proliferar en un cultivo sin experimentar fenómenos de senescencia.⁴⁴ Han permitido el estudio de oncogenes, mutaciones y puntos de ruptura de translocaciones, al servir como fuente de

material.⁴⁵ Permiten el desarrollo de fármacos y el estudio de su mecanismo de acción, tanto clásicos como dirigidos.

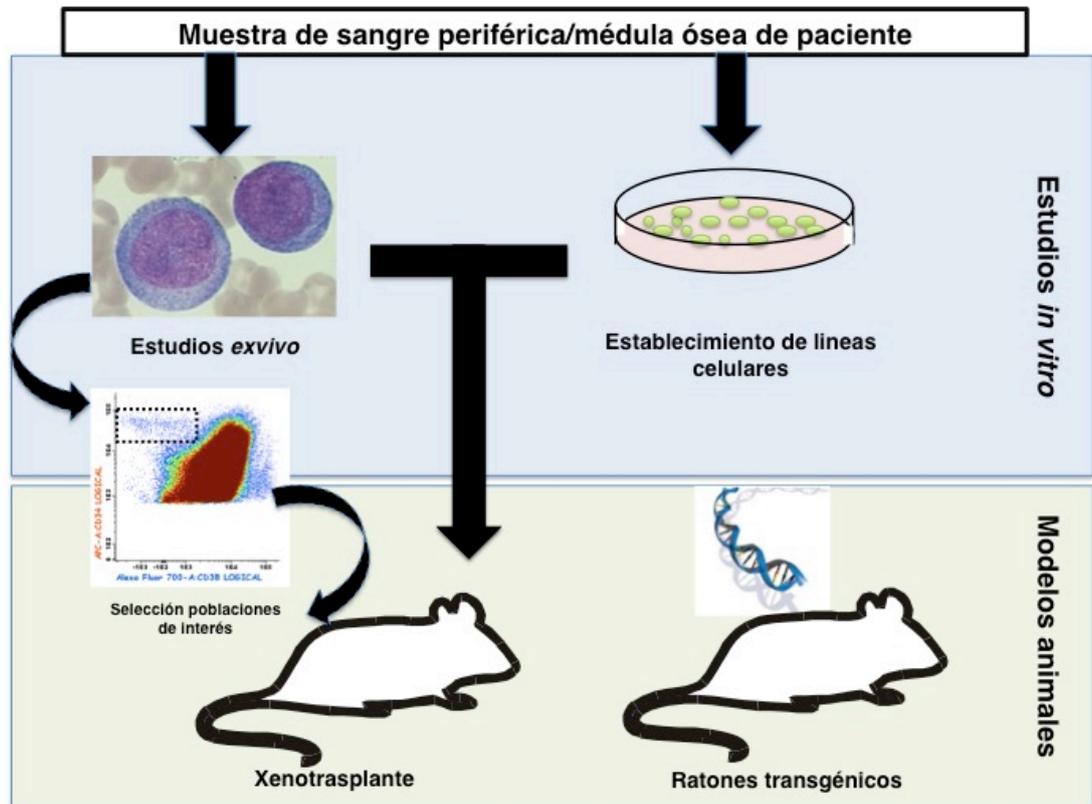


Figura 1: Modelos de estudio de las leucemias agudas mieloblásticas

Modelos murinos

Los modelos animales transgénicos permiten una aproximación a los eventos iniciales de la leucemogénesis, por lo que pueden contribuir a la caracterización funcional de los oncogenes y los daños necesarios para la transformación leucémica. Sin embargo, estos estudios han de ser valorados adecuadamente cuando se extrapolan los resultados a humanos, ya que pueden existir diferencias en los mecanismos de transformación entre las especies.^{46,47}

Estudios in vitro de células hemopoyéticas primarias

Los modelos anteriores presentan el problema de no estudiar las células en su contexto adecuado. En estos modelos, los oncogenes a estudio son introducidos en células hemopoyéticas primitivas por medio de retrovirus, provocando leucemogénesis y permitiendo el estudio de las fases iniciales de la leucemogénesis. Los primeros estudios datan de los años 90,⁴⁸ y la prueba de la eficacia de este método de estudio llegó poco después.⁴⁹ Estos métodos también permiten estudio de características funcionales de los blastos leucémicos, como por ejemplo, la resistencia a drogas.

Modelos de xenotrasplante

Los modelos de xenotrasplante en ratones inmunodeprimidos han permitido caracterizar las poblaciones responsables para el inicio de la leucemia.⁵⁰

Citogenética

La clasificación de las LAM se ha basado fundamentalmente en la morfología, reflejando el tipo celular predominante y correlacionándolo con la célula que se presupone su contrapartida normal.⁵¹ La correlación de las anomalías citogenéticas con las características morfológicas ha sido posible gracias al desarrollo del sistema de clasificación FAB.

El estudio citogenético es fundamental en el manejo de los pacientes diagnosticados de LMA dado que permite identificar grupos con distinto pronóstico,^{24,55-58} así como avanzar en el conocimiento de la patología molecular de las LAM.⁵² En las primeras series de pacientes, aproximadamente, un 50% presentaban cariotipos anormales en el estudio con bandas G, en el momento actual, se pueden detectar cariotipos clonales hasta en el 85% de los pacientes con LAM.

Ganancias y pérdidas cromosómicas

Existe un patrón recurrente de ganancias y pérdidas cromosómicas en las LAM. Los cambios más frecuentemente reportados son trisomía del cromosoma 8, monosomía del 7, monosomía del 5.⁵⁴ Las pérdidas o deleciones de los cromosomas 5 y 7 son especialmente características de las LAM secundarias a tratamiento con agentes alquilantes o Radioterapia. Recientemente se ha descrito por el grupo HOVON que la monosomía empeoraba drásticamente el pronóstico de los pacientes con LAM de novo. Las anomalías estructurales solo modificaban pronóstico en conjunción con una monosomía de un autosoma. (SG a 4 años 24 vs 4%). El concepto de Cariotipo monosómico como predictor de mal pronóstico

se refiere a la presencia de dos o más monosomías en autosomas (SG a 4 años: 3%) o a la monosomía de un cromosoma junto con otra alteración estructural (SG a 4 años: 4%).⁵³

La pérdida del cromosoma Y es la segunda alteración cromosómica más frecuente, sin embargo, el significado de esta alteración es discutido, ya que las células de donantes sanos, particularmente en pacientes mayores de 60 años.⁵⁵ Las deleciones del cromosoma 17 típicamente implican la deleción del gen supresor de tumores p53 y han sido descritas en pacientes con LAM, normalmente en el seno de una translocación no balanceada.⁵⁶

Pronóstico	Alteraciones citogenéticas
Bueno	t(8;21) inv(16);(16;16) t(15;17)
Intermedio	Cariotipo normal -Y
Adverso	-5, -7, del (5q) y del (7q) (como anomalías aisladas) abn 11q23 t(6;9) Cariotipo anormal no incluido en otros grupos
Muy adverso	Cariotipo monosómico abn3q26

Tabla 1: Alteraciones citogenéticas en las leucemias agudas mieloblásticas. Adaptado de Breems *et al.*⁵³

Alteraciones estructurales recurrentes

Estas alteraciones incluyen traslocaciones cromosómicas e inversiones.

t(8;21)

La translocación balanceada *t(8;21)* es un evento frecuente en pacientes con LAM, encontrándose hasta el 18% de los casos con cariotipo anormal y hasta

en el 40% de las LAM con maduración.^{55,56,64,65} En la t(8;21) el gen RUNX1 (AML1, Core Binding Factor alfa-2, CBFA2) en el cromosoma 21, se fusiona con el gen RUNX1T1 (ETO, MTG8) en el cromosoma 8, formando la proteína quimérica RUNX1/RUNX1T1.⁵⁷⁻⁵⁹ RUNX1 heterodimeriza Core Binding Factor beta (CBF β) para formar un factor de transcripción, que se une al *enhancer core motif* y regula genes implicados en el crecimiento, diferenciación y función de células de estirpe mieloide.⁶⁰ Los ratones mutantes deficientes en RUNX1 o CBF β presentan déficit de hematopoyesis y mueren durante la embriogénesis, lo que indica que el CBF es esencial para la hematopoyesis global y no solo la de la serie mieloide.⁶¹ Los ratones mutantes RUNX1/RUNX1T1 presentan alteración en la maduración mieloide pero sin desarrollar una leucemia,^{61,62} necesitando un segundo evento para desarrollar una LAM. RUNX1/RUNX1T1 interacciona con el *enhancer core motif* ya que el dominio de unión a DNA está conservado en la proteína de fusión, pero interfiere con la activación normal de la transcripción inducida por RUNX1/CBF β principalmente por el reclutamiento de Histona Deacetilasas (HDACs).^{60, 61, 63} Además, RUNX1/RUNX1T1 tiene otras funciones patológicas como aumentar la expresión de la proteína antiapoptótica BCL2 o c-jun, disminuir la expresión de genes reguladores de ciclo celular como p14ARF, p15INK4b, o p21,⁶⁴ y activar genes implicados en mantenimiento de célula madre, como la vía de Wnt- β catenina.⁶⁵⁻⁶⁹ De esta forma, la leucemogénesis inducida por RUNX1/RUNX1T1 resulta de la regulación transcripcional de AML1 alterada y activación de genes que activan las vías anti-apoptóticas y de proliferación y evitan la diferenciación celular.⁷⁰ Las LAM con t(8;21) tiene un pronóstico favorable en adultos, salvo que se asocie a del(9q).⁷¹⁻⁷⁴ La terapia postremisión intensiva permite una duración de la respuesta aumentada.⁷⁵ Debido a su mecanismo patogénico específico, las

leucemias que afectan a CBF podrían responder a tratamientos epigenéticos, como los inhibidores de HDACs, recientemente se han presentado los resultados de un ensayo clínico en pacientes con LAM avanzada demostrando actividad antileucémica en monoterapia con Romidepsina en 5 de 7 pacientes.⁷⁶

t(15;17)

La Leucemia Aguda Promielocítica presenta típicamente una translocación $t(15;17)(q22;q11-12)$ que es diagnóstica, ya que no se encuentra en otro tipo de leucemia o neoplasia.⁷⁷ Dado que no es objetivo de este trabajo el estudio de nuevos fármacos en Leucemias Agudas Promielocíticas, no realizaremos más comentarios sobre ellas.

Inv(16) y t(16;16)

Existe una relación entre la Leucemia Mielomonocítica Aguda (FAB M4Eo) y alteraciones del cromosoma 16.^{78,79} El punto de ruptura en 16q22 se produce cerca del final de la región codificante de CBF; el punto de ruptura en 16p se produce en el gen MYH11 (gen de la cadena pesada de miosina de músculo liso). La proteína de fusión contiene la región 5' de CBF β con la porción que heterodimeriza con RUNX1 fusionada con MYH11,^{80,81} lo que provoca pérdida de función del complejo RUNX1/CBF β , alterando la transcripción.^{82, 83} Los ratones transgénicos CBF β /MYH11 presentan alteración de la maduración y displasia de la serie mieloide,⁸⁴ y, al igual que con RUNX1/RUNX1T1, los ratones mutantes necesitan un segundo *hit* para desarrollar una LAM.⁸⁵ Los pacientes con $inv(16)$ or $t(16;16)$ tienen una buena respuesta a quimioterapia intensiva, especialmente con dosis altas de citarabina.⁷⁵

Reordenamientos que afectan a 11q

Los reordenamientos de 11q23 son frecuentes en las Leucemias Agudas Monoblásticas, particularmente en los casos con monoblastos pobremente diferenciados (LAM M5a).^{86,87} Esta asociación es particularmente frecuente en LAM infantil.⁵⁴ Las translocaciones que afectan a 11q23 afectan al gen MLL,⁸⁸ y tienen unas características especiales: Hay más de 50 reordenamientos distintos que afectan a MLL,⁸⁹⁻⁹¹ además, estas translocaciones ocurren tanto en LAL como en LAM, lo que sugiere que el gen MLL puede estar implicado en la diferenciación de la célula madre hemopoyética a linaje linfoide o mieloide o que este gen esté activo en ambos linajes. La proteína MLL contiene un dominio de unión al ADN, un dominio activador de la transcripción y un dominio represor.⁹² Las translocaciones provocan la formación de una proteína quimérica en el cromosoma derivativo 11, perdiendo el dominio activador de la transcripción.⁹²

t(3;3) e inv(3)

El gen EVI1, localizado en 3q26 no se expresa en células hemopoyéticas pero se activa en reordenamientos que ocurren en 5' en el caso de t(3;3) o 3' en el caso de inv(3).⁹³ EVI1 es un factor de transcripción que contiene un dominio en dedos de zinc. La expresión de EVI1 también se ha detectado en LAM con cariotipo normal (LAM-CN),⁹⁴ confirmando mal pronóstico,⁹⁵ sugiriendo que su activación puede ser por mecanismos distintos a la translocación.⁹⁶ Los mecanismos por los que EVI1 induce leucemogénesis no son claros.⁹⁷

Biología Molecular

La genética molecular ha permitido un mejor conocimiento de la fisiopatología de la enfermedad, definir con mayor precisión los subgrupos con distinto pronóstico e identificar dianas para terapias dirigidas. Estos avances son especialmente patentes dentro del grupo de pacientes con LAM con Cariotipo Normal (LAM-CN)

Alteraciones en receptores transmembrana

FLT3

Es el homólogo humano del Fetal Liver Tyrosine (FLT) Kinase 3, clonado hace 15 años.⁹⁸ Su producto es una proteína transmembrana de la familia de receptores tirosin kinasa clase III. Su porción extracelular se une a su ligando (FLT3 ligand) produciendo proliferación de células dendríticas y progenitores hemopoyéticos.⁹⁹ La mutación más frecuente es la ITD (Internal Tandem Duplication), que aparece en un 25-30% de pacientes diagnosticados de LAM.¹⁰⁰ Un 7% de las LAM, tienen una mutación puntual D835Y,¹⁰¹ y un 2% tienen mutaciones en dominio juxtamembrana.¹⁰² Además, FLT3 está sobreexpresado hasta en el 50% del resto de casos.^{100,103}

La ITD consiste en una inserción en los exones 14 o 15 sin cambio de la pauta de lectura, que lleva a una pérdida de la capacidad de autoinhibición, lo que funcionalmente se traduce en una activación constante.¹⁰⁴ La activación de FLT3 produce un aumento de la proliferación celular, inhibición de la apoptosis y un paro en la maduración, al disminuir la expresión de PU1 y CEBPα (CCAAT/Enhancer-Binding Protein Alpha) ^{103,105-107}

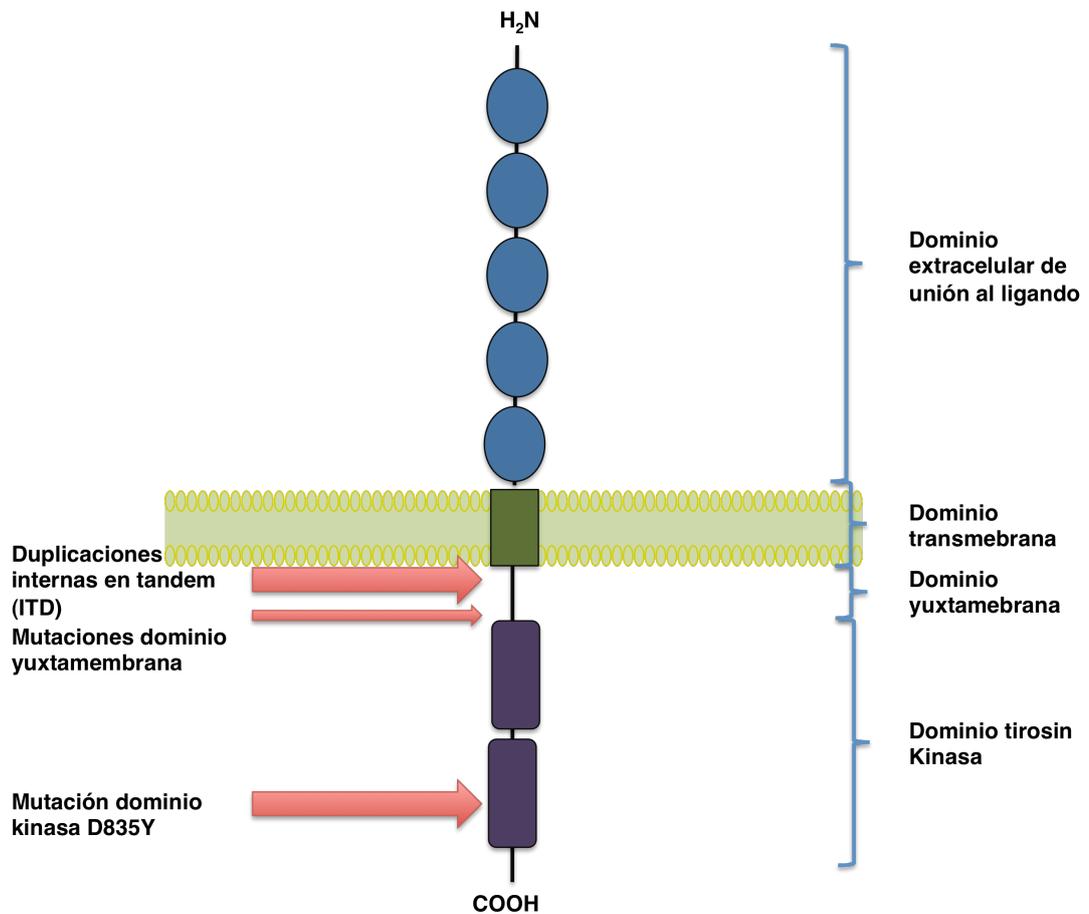


Figura 2: Estructura esquemática de FLT3. En la parte extracelular se encuentra los 5 dominios inmunoglobulina, que actúan como receptor, que se siguen de un único dominio transmembrana, que se continúa por un dominio yuxtamembrana. El dominio tirosina kinasa se encuentra en la parte COOH terminal de la proteína. Las localizaciones de las mutaciones más frecuentes se muestran con flechas.

Las vías que inducen proliferación son fundamentalmente JAK2/STAT5 (que no se activa por WT-FLT3), Ras/Raf/MEK/Erk, Src Kinasas y PI3K/AKT fundamentalmente.¹⁰⁶⁻¹⁰⁹

Los pacientes que presentan FLT3-LM (FLT3-*Lenght mutation*, FLT3-ITD) en el seno de una LAM-CN suelen presentar una mayor blastosis en sangre y médula y mayor frecuencia de formas hiperleucocitósicas. La probabilidad de alcanzar una remisión completa es menor, pero no de forma estadísticamente significativa, sin

embargo, la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global sí son claramente inferiores en los pacientes con una FLT-3 ITD.^{39,40,110} Además, la ratio entre FLT3-LM y FLT3-WT tiene valor pronóstico.¹⁰¹

Las mutaciones de FLT3 se pueden detectar en células CD34+ CD38- de pacientes con LAM.¹¹¹ Las vías activadas por FLT3-ITD y la vía de WNT presentan sinergia para la transformación leucémica.¹¹² Sin embargo, la mutación de FLT3 no necesariamente se encuentra en la recaída.^{100,113,114} y los pacientes que eran FLT3-WT pueden adquirir FLT3-LM en la recaída.¹¹³ FLT3-ITD es un factor importante en el inicio y el mantenimiento de la enfermedad, pero puede ser una mutación secundaria en un subclon, al que le confiere una ventaja proliferativa por lo que la recaída puede ser por un subclon diferente o porque el clon adquiera una mutación en la misma ruta (*downstream*) que haga que FLT3-ITD no sea necesario. Esto conlleva importantes implicaciones para EMR y para terapia con inhibidores de FLT3.

En cuanto a las mutaciones en el dominio Kinasa (FLT3-TKD), clásicamente se atribuyó un valor pronóstico adverso, sin embargo, parece ser que no modifica la supervivencia global en la mayoría de los pacientes, la empeora en aquellos en los que se asocia a PML/RAR α , MLL o FLT-ITD y puede ejercer un factor pronóstico favorable en aquellos con mutación en CEBP α o NPM1.¹¹⁵

KIT

Al igual que FLT3, es un receptor tirosin kinasa clase III. Se encuentra expresado en un 80% de las LAM.¹¹⁶ En LAM, las mutaciones más frecuentes se localizan en los dominios extracelulares, principalmente en Exon 8.¹¹⁷ Aparece mutación en el 22% pacientes con t(8;21) y un 29% de los pacientes con inv(16). Las mutaciones en los dominios extracelulares favorecen la dimerización del

receptor y por lo tanto, provocan hiperactividad, con la subsecuente actividad de las vías de Ras/Raf/MEK/Erk y PI3K/Akt.¹¹⁸ La mutación en los dominios extracelulares provoca la activación de STAT3, que lleva a aumento de niveles de BCL XL y MYC y actividad de vía de PI3K/Akt, sin embargo, no parece activar la vía de Ras/Raf/MEK/Erk.^{119,120} Las mutaciones en el Exon 17 (Cambios de base en D816 o N822 del asa de activación) también se asocian a mal pronóstico.¹¹⁷

La importancia de las mutaciones de KIT es poder definir un grupo de pacientes que se beneficien de tratamiento con inhibidores de tirosina kinasas, en ese sentido, imatinib puede ser eficaz en un grupo de pacientes con mutación de KIT,¹¹⁸ mientras que existe evidencia de que también puede ser eficaz en pacientes que expresen KIT sin evidencia de mutación.^{121, 122} Además, las mutaciones más frecuentes: D816V y D816Y son resistentes a imatinib, pero inhibidores como el PCK412 pueden vencer esta resistencia.¹²³

Alteraciones en diferenciación

NPM1

El descubrimiento en 2005 de que el producto del gen NPM1 (nucleofosfina) se localizaba en el citoplasma de los blastos en una importante proporción de pacientes, fundamentalmente en aquellos con cariotipo normal constituyó una notable contribución en el conocimiento de la patogenia molecular de las LAM.³⁸ La nucleofosmina es una proteína expresada ubicuamente, que de forma continua es trasladada del núcleo a citoplasma y que está implicada en la estabilidad de los nucleolos, regulación del ensamblaje ribosomal y su transporte nucleocitoplásmico, el control de ciclo celular y la regulación de P53 y p14^{ARF}.¹²⁴

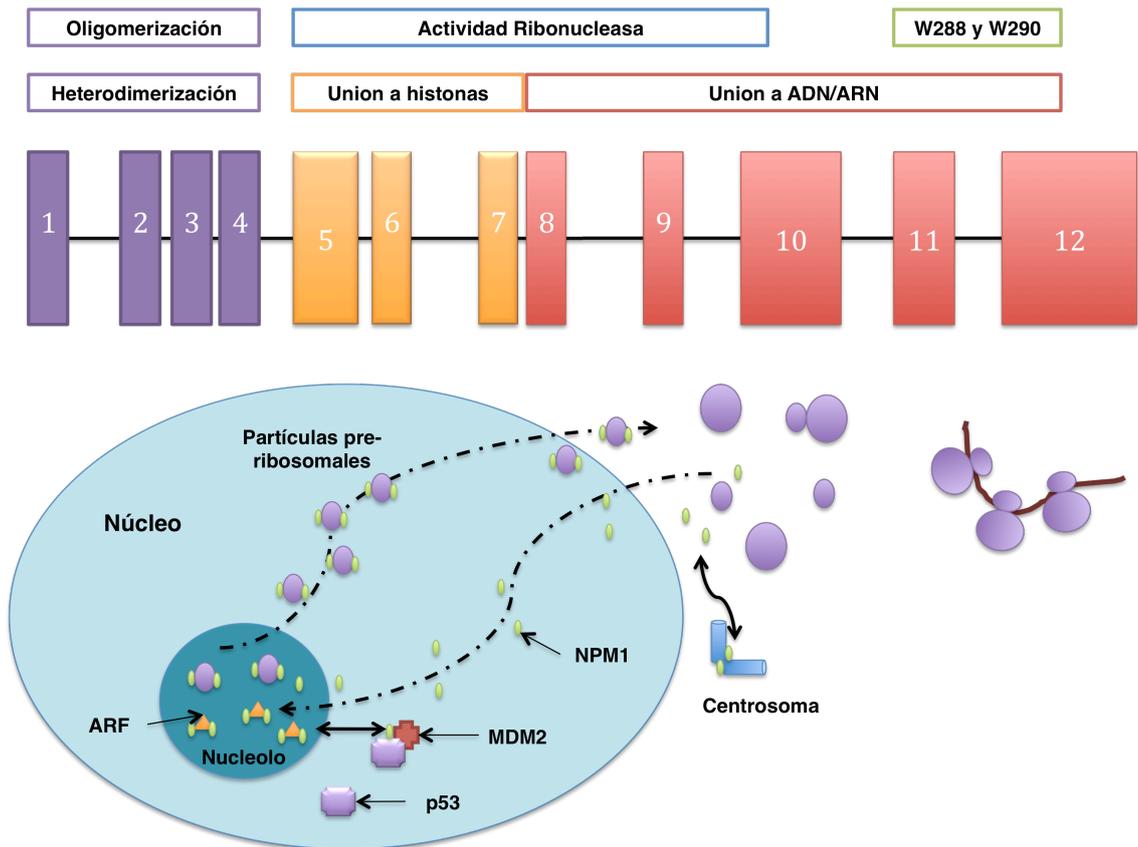


Figura 3: Estructura esquemática y funciones principales de NPM1

En el trabajo de Falini se demostró que la mutación de NPM1 (NPM1mut) es la alteración génica más común dentro del grupo de LAM-CN,³⁸ con una frecuencia entre 45-62% dependiendo de las series.¹²⁵ Se han descrito al menos unas 40 mutaciones distintas, las cuales causan pérdida de los triptofanos 288 y 290 o sólo del último que son críticos para la localización nuclear de la proteína.¹²⁶ Clásicamente se ha dicho que la mutación de NPM1 se asocia con buen pronóstico,³⁸ sin embargo, dado que la mutación de NPM1 se suele asociar con otras lesiones génicas, principalmente con FLT3-LM (hasta el 40% de los pacientes NPM1mut) su valor pronóstico ha de verse en el conjunto de las alteraciones.^{125, 127-130} Así pues, los pacientes FLT3-WT NPM1mut son los que realmente presentan buen pronóstico, mientras que los pacientes FLT3-LM NPM1mut tienen un

pronóstico similar a los FLT3-LM NPM1-WT.^{127, 128, 130, 131} Además de lo anterior, parece claro que los pacientes con NPM1mut, especialmente aquellos que son FLT3-WT, se benefician del tratamiento con ATRA tras el inicio de la quimioterapia de inducción.¹³⁰ La base de este hecho no está aclarada, pero parece intervenir la modulación de la sensibilidad de las células NPMmut a drogas, ya que se observa un efecto sinérgico cuando el ATRA se administra tras los citostáticos.¹³²⁻¹³⁴

CEBPα

CCAAT/Enhancer-Binding Protein Alpha es un factor de transcripción indispensable para la maduración de progenitores multipotentes hacia línea mieloide (junto con PU-1, IRF-8, RUNX1, SCL, y GFI1).^{135,136} La función fisiológica de CEBPα es provocar la parada proliferativa e iniciar el programa de diferenciación terminal.¹³⁶ Los mecanismos por los que CEBPα produce la inhibición del crecimiento son su interacción con CDK2/CDK4, regulación positiva de p21^{CIP1}, el remodelado de cromatina y la regulación negativa de c-myc.¹³⁶ Las mutaciones por pérdida de función se han implicado en la patogenia de las LAM. Dos tipos de mutaciones se han implicado en LAM esporádica o familiar.¹³⁷⁻¹³⁹ Por un lado, mutaciones nonsense en la región N-terminal que promueven la formación de un CEBPα truncado que actúa de dominante negativo, impidiendo la función del alelo sano.^{136, 140} El otro tipo de mutaciones son en el dominio de cremallera de leucina C-terminal que provoca proteínas CEBPα con menor capacidad de unión al ADN.¹³⁶ Además de la mutación, la función de CEBPα está alterada por mecanismos post-transcripcionales en reordenamientos de CBF.^{141,142} Mientras que claramente se ha demostrado que las mutaciones de CEBPα conllevan un buen pronóstico, la razón de este hecho permanece desconocida.¹⁴³

Vías de señalización intracelular

Sólo un 50% de los pacientes presentarán alguna de las alteraciones citogenéticas o mutaciones anteriormente comentadas,¹⁴⁴ de ahí la importancia de conocer las alteraciones que ocurren en las vías de señalización intracelular de las LAM.

Las vías de Ras/Raf/MER/ERK, JAK/STAT y PI3K/PTEN/Akt/mTOR se encuentran frecuentemente activadas en los pacientes con LAM, y se asocian a un peor pronóstico.¹⁴⁵⁻¹⁴⁷ En esta parte nos centraremos en realizar una breve revisión de estas vías y cómo pueden permitir el desarrollo de nuevos fármacos.

Ras/Raf/MEK/Erk

La vía de Ras/Raf/MEK/Erk se activa en respuesta a muchos factores de crecimiento y citocinas que inducen proliferación celular y previenen la apoptosis en las células hemopoyéticas.¹⁴⁸⁻¹⁵³ Tras unirse el ligando al receptor, Shc se une con el extremo carboxiterminal del receptor transmembrana,¹⁵⁴ y recluta a Grb2/Sos(GTP-exchange complex growth factor receptor bound-2/son of sevenless exchange) lo que provoca que el Ras unido a la membrana se una a GTP.¹⁵⁵ Ras:GTP recluta a Raf que se activa, probablemente por una kinasa de la familia de Src.¹⁵⁶

Raf es una familia de genes que codifica para RAF1, ARAF y BRAF. Las proteínas de la familia de Raf tienen tres dominios funcionales distintos. CR1 es necesario para la unión y subsecuente activación, CR2 es el dominio regulador y CR3 es el dominio kinasa. La delección de CR1 y CR2 provoca una proteína constitutivamente activada.¹⁵⁷

Las kinasas Raf son necesarias para la fosforilación de MEK (Mitogen-associated/extracellular regulated kinase-1)^{156, 158} y MEK fosforila ERK1 y ERK2

(extracellular regulated kinases) en residuos específicos de T e Y.^{156, 158} Las quinasas de serina ERK1 y ERK2 fosforilan y activan una variedad de sustratos.¹⁵⁹ Entre los que se incluyen Elk1 y Fos que están implicados en proliferación y supervivencia. La activación de Ras/Raf/MEK/Erk también modula la expresión de proteínas implicadas en apoptosis como Bcl-2, Bad, Bim, MCL-1, Caspasa 9 y survivina.¹⁴⁹

Raf, además, tiene acciones independientes de MEK y Erk, principalmente dirigidas a la prevención de la apoptosis,¹⁶⁰ muchas de estas acciones se basan en su interacción con MST-2 (Mammalian sterile 20-like kinase), que tiene una acción proapoptótica y es inhibida por Raf.^{161,162}

Las mutaciones que provocan la activación constitutiva de Ras ocurren en hasta un 30% de los cánceres, de hecho NRAS está mutado y constitutivamente activado en un 10%-20% LAM, KRAS en 5%-15% de las LAM, mientras que es raro que HRAS esté mutado.¹⁶³ Posiblemente las mutaciones de Ras estén infraestimadas, ya que existen mutaciones activantes de Ras con capacidad leucemógena en residuos alternativos.¹⁶⁴ Se ha sugerido que los pacientes con mutaciones de Ras se pueden beneficiar de consolidaciones con altas dosis de Ara-C.¹⁶⁵ Las mutaciones de BRAF son más frecuentes que las de RAF1 o ARAF en muchos tumores. Las mutaciones de BRAF en línea germinal parecen ser más frecuentes en LAM asociada a tratamiento quimioterápico previo.¹⁶⁶ Dependiendo de las series, hasta un 50% de las LAM presentan activación de la vía Ras/Raf/MEK/Erk sin mutación conocida.¹⁶⁷ La expresión elevada de Erk en LAM también se ha asociado a mal pronóstico,^{168, 169} y por tanto, su inhibición puede ser una nueva línea terapéutica.¹⁶⁹

Jak/STAT

La vía de Jak/STAT es otra de las vías principales de transducción de señales desde receptores extracelulares.¹⁴⁸ La vía consiste en tres familias de genes: JAK (Janus Kinase), STAT (Signal Transducer and Activators of Transcription) y SOCS/CIS (*supressor of cytokine signalling/ cytokine inducing SH2-containing*), que sirve para regular a la baja la actividad de Jak/STAT.¹⁴⁸

Jak es una familia de tirosin kinasas, con 4 miembros descubiertos hasta la fecha (JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2).¹⁷⁰ La agregación de receptores de citocinas provoca la formación de homodímeros y heterodímeros que permite la activación de las Jak asociadas a ellos.

La familia de STAT consta de 7 miembros (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b y STAT6).¹⁷⁰ Las funciones de la vía de Jak/STAT en la hematopoyesis normal han sido investigadas en modelos murinos. Los ratones STAT3^{-/-} presentan muerte fetal por múltiples defectos,¹⁷¹ las deleciones de otros miembros de la familia de STAT producen alteración en la secreción de citocinas, sin defectos embrionarios. La deleción de Jak1 produce muerte fetal por alteraciones neurológica; ¹⁴⁹ la deleción de Jak2 produce muerte por defectos en la hematopoyesis y los ratones Jak3^{-/-} presentan alteración tímica.¹⁴⁹ La familia de Jak/STAT está regulada negativamente por SOCS/SIS, que se une al dominio quinasa de Jak^{172, 173}. Otros reguladores negativos de la ruta de Jak/STAT son las protein-fosfatasa CD45 y PTPeC (Protein tyrosine phosphatase-e C) ^{174,175}

STAT 3 tiene propiedades oncogénicas, al aumentar la expresión de factores antiapoptóticos, especialmente BCL-XL.¹⁷⁶

PI3K/PTEN/Akt/mTOR

La unión del factor del ligando a su receptor puede también producir la rápida activación de la PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase)^{149, 177} PI3K consta de una unidad reguladora que contiene dominios SH2 y SH3 y una unidad catalítica.¹⁷⁸ PI3K realmente es una familia de genes, con al menos 8 formas de la unidad catalítica descritas y 7 de la unidad reguladora, con funciones distintas y no del todo conocidas.¹⁷⁹ El sustrato favorito de las PI3K de clase I es el fosfatidilinositos 4,5 bisfosfato, que es fosforilado a fosfatidilinositos 3,4,5 trisfosfato, que sirve de anclaje para las proteínas como Akt o PDK1, que contienen un dominio de pleckstrin homology.

Akt (o PKB, protein kinase B) tiene tres isoformas (Akt-1, Akt-2 y Akt-3) que PDK1 fosforila en residuos específicos, dando lugar a su activación. La Akt activada se encuentra tanto en el núcleo como en el citosol, teniendo efectos antiapoptóticos cuando su localización es nuclear.^{180, 181} Se ha postulado que Akt fosforila a más de 9000 proteínas distintas, por lo que es un regulador fundamental para la célula.^{182, 183} Akt además, fosforila I-kK (I-kB kinase), que es marcado para degradación por el proteasoma, por lo que dejará de inhibir a NF-kB.¹⁸⁴

Akt puede fosforilar CREB que regula la expresión de genes antiapoptóticos como Mcl-1, Bcl-2 y c-Jun.¹⁴⁹ Además, la activación de la vía Akt provoca activación de mTOR (mammalian target of rapamycin) y proteínas kinasas ribosomales como p70^{S6K}.^{149, 153} Akt fosforila a proteínas implicadas en el crecimiento celular, como GSK-3b (Glycogen synthase 3-b), ASK1, Bim, Bad, MDM-2, p21^{CIP1}, XIAP y Foxo3a.¹⁴⁹

La vía de Akt está regulada negativamente por fosfatasas, como PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten) que elimina el fosfato en posición 3 del inositol trifosfato desactivando la vía.¹⁴⁹ Otras fosfatasas como SHIP-1 y SHIP-2, eliminan otros residuos de fosfato del inositol trifosfato distintos (posición 5) provocando también inactivación de la señal. La pérdida de función de estas fosfatasas pueden llevar a la progresión tumoral.¹⁴⁹

Wnt-b catenina

La familia de Wnt está formada al menos por 19 proteínas altamente conservadas que regulan los procesos del desarrollo, aunque también está implicada en procesos de autorenovación y diferenciación de HSC y está implicada en la oncogénesis cuando está constitutivamente activada.¹⁸⁵⁻¹⁸⁸ La sobreexpresión vía de Wnt en LAM es frecuente y poco estudiada por el momento.¹⁸⁹ aunque parece ensombrecer el pronóstico de los pacientes que presentan activación de esta vía.¹⁹⁰

Epigenética

Aunque al principio se pensó que era un simple “embalaje” para el ADN, la configuración de la cromatina constituye un aspecto fundamental de la biología celular, implicando funciones como el control transcripcional, estabilidad cromosómica, reparación de ADN y replicación de ADN.¹⁹¹ La interacción entre el ADN y la cromatina con sus modificaciones codifica una capa de información, que puede ser preservada durante la división celular.¹⁹²

La información epigenética está recogida por tres mecanismos: Metilación del ADN, Modificaciones de histonas y ARN no codificante.

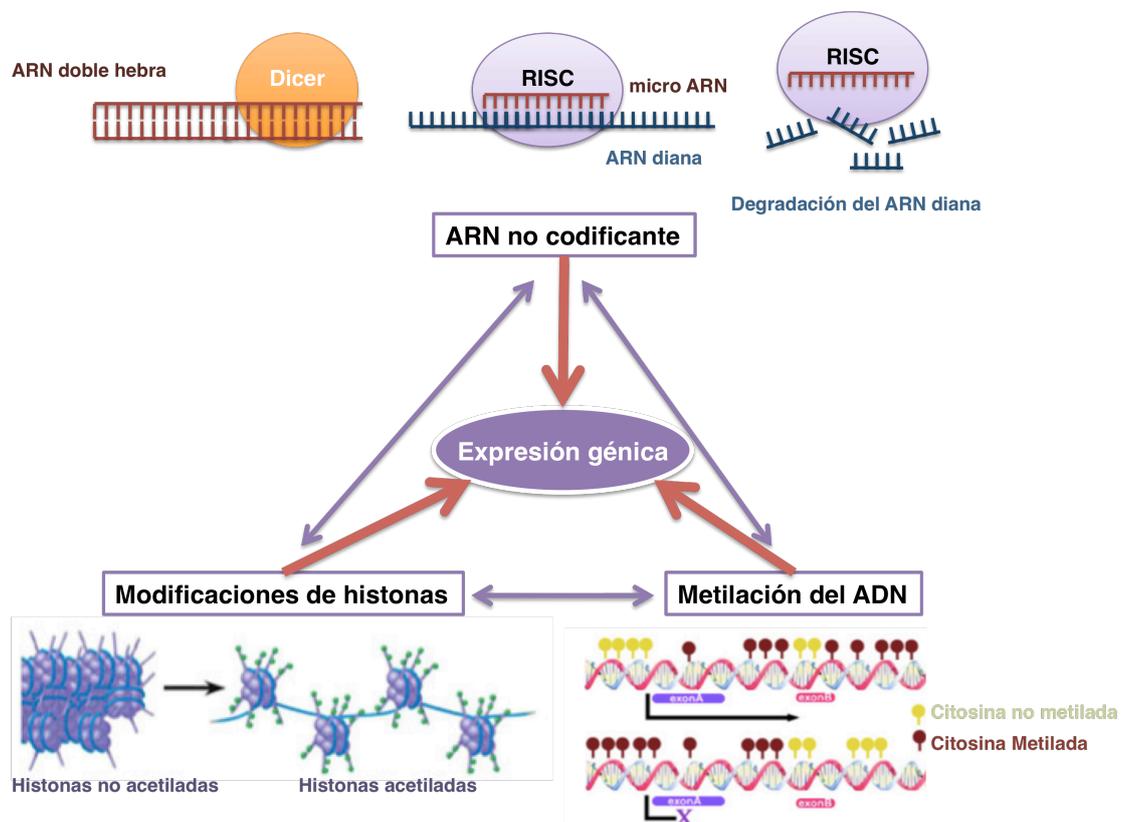


Figura 4: Principales mecanismos de regulación epigenética.

Metilación del ADN

Las DNA metiltransferasas catalizan la adición de un grupo metilo a la posición 5' del anillo de citosina de las secuencias CpG, localizadas principalmente en la región 5' de los genes (islas CpG). La principal función de la metilación de ADN es la regulación transcripcional. Un gran número de estudios han demostrado una correlación inversa entre la metilación de las islas CpG y la expresión génica.¹⁹¹

Las leucemias agudas presenta alteraciones con respecto al patrón de metilación normal,^{193, 194} además, estos cambios no son aleatorios, si no que un grupo de genes son preferentemente inactivados por metilación en LAM. Además, estos cambios son específicos de enfermedad.¹⁹⁵

Modificaciones de Histonas

Las cuatro histonas del núcleo (H2A, H2B, H3 y H4) junto con las 147pb del ADN forman el nucleosoma, que es la unidad estructural de la cromatina. El extremo N-terminal de las histonas está sujeto a cambios covalentes, entre los que se encuentra la acetilación, metilación, ubiquitinación, ADP-ribosilación, sumolación de lisinas, metilación de argininas y fosforilación de serinas y treoninas.¹⁹⁶ Las modificaciones covalentes, salvo la metilación, cambian la carga eléctrica de la proteína, reduciendo la afinidad de las interacciones internucleosómicas o entre el ADN y las histonas. La acetilación de las histonas H3 y H4 por las Histona acetiltransferasa (HAT) promueve la transcripción, mientras que la acción del las Histona Deacetilasas (HDAC) promueve la formación de heterocromatina, inhibiendo la transcripción.¹⁹¹ En las leucemias agudas

mieloblasticas, el balance entre HATs y HDACs esta inclinado hacia los HDACs, y fármacos que puedan revertir esta situación tienen una base racional para su investigación.

ARN no codificante

La modulación de la expresión génica por ARN no codificante es principalmente debida a la silenciación post-transcripcional mediante oligonucleótidos antisentido contra el producto que se pretende inhibir.¹⁹¹ Los microRNAs (miRNAs) son pequeñas moléculas de ARN específicas de regiones no traducidas en el extremo 3' de los genes, de forma que producen una reducción específica de su producto.^{197,198}

El estudio de las modificaciones de cromatina, además de constituir una oportunidad de contribuir al conocimiento acerca de la patología molecular de las LAM, puede generar nuevos tratamientos para los pacientes afectos de estas enfermedades.¹⁹⁹

Interacciones de la célula blástica con el estroma

Las células progenitoras hematopoyéticas y leucémicas residen en áreas especializadas de la médula ósea (nichos) que presentan las condiciones estructurales y biológicas idóneas para su proliferación y crecimiento.²⁰⁰ Las células madre leucémicas pueden mantenerse en esos nichos evitando la muerte por agentes quimioterápicos.²⁰¹ Los mecanismos de protección inducida por el estroma son múltiples y están interrelacionados, implicando una serie de citocinas, quimiocinas y moléculas de adhesión, que pueden aumentar las proteínas antiapoptóticas.^{202,203}

El stroma-secreted median la migración, implantación y movilización de las células hemopoyéticas, lo que²⁰⁴⁻²⁰⁷ La unión de ²⁰⁸ que está mediado intracelularmente por las vías de ERK y PI3K.²⁰⁹ Los niveles de CXCR4 tanto en superficie como intracelulares están elevados en un grupo de LAM, principalmente en aquellos pacientes con FLT3-LM,²¹⁰ sin embargo, el pronóstico desfavorable de los niveles altos de CXCR4 es independiente del estado mutacional de FLT3.^{211,212}

Ciclo celular

La capacidad de proliferación de una célula viene determinada por la maquinaria molecular implicada en su ciclo celular, que ejecuta de forma ordenada una serie de procesos que culminarán con la división de la célula.

El ciclo celular se divide en varias fases. En la interfase la célula crece y duplica su material genético. La interfase se divide en tres subfases: G_1 , S y G_2 . En G_1 se sintetizan las proteínas necesarias para la progresión a fase S ("síntesis"), en la que se produce la replicación del material genético. La fase G_2 , precede a la fase de mitosis o fase M, en la que tiene lugar la división nuclear y citoplasmática. A lo largo del ciclo existen puntos de control o checkpoints que supervisan momentos críticos del ciclo celular, como son el tamaño de las células, la replicación del ADN, la segregación de los cromosomas y la presencia de lesiones en el ADN.²¹³⁻²¹⁵ Los puntos de control que responden a señales externas actúan principalmente en G_1 . En esta fase se ha definido un periodo de tiempo denominado en mamíferos punto R o de restricción, en el cual la célula comprueba que ha generado la masa necesaria para seguir adelante y comenzar la síntesis de ADN. La superación de este punto conduce a las células a la progresión del ciclo celular, volviéndose refractarias a la acción de señales extracelulares.^{215,216} Al final de la fase G_2 existe el punto de control G_2/M , en el que la célula comprueba que ha duplicado su masa y que ha duplicado su ADN únicamente una vez.^{213, 215} Una vez superado este punto la célula está preparada para entrar en mitosis. En esta fase, el punto de control M, asegura una correcta organización del huso mitótico. Los checkpoints

o puntos de control de daño en el ADN actúan en tres fases del ciclo celular: en la transición G₁/S, en el control de la progresión a través de la fase S, y en la transición G₂/M y aseguran que una célula con daño en el ADN o una incorrecta replicación no progrese a través del ciclo.^{215,217}

Base molecular del ciclo: CDKs y Ciclinas.

Las principales proteínas del ciclo celular son las ciclinas (CCN) y las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs: Cyclin-Dependent Kinases).^{218, 219} Estos dos tipos de proteínas se asocian formando complejos, en los que la quinasa es la subunidad catalítica y la ciclina la subunidad reguladora. Estos complejos están sometidos a un importante sistema de regulación por múltiples vías, ya que son los encargados de activar el ciclo celular al fosforilar a diversos sustratos entre los que se encuentra principalmente la proteína retinoblastoma (Rb).¹⁴⁸

Las CDKs son quinasas serina/treonina que se caracterizan por necesitar la unión de la ciclina para ser activas.²²⁰ Cada CDK se asocia a una o varias ciclinas de forma específica, y realiza su función en un punto concreto del ciclo celular. Las ciclinas presentan una homología superior al 50% y se unen a las quinasas a través de una secuencia conservada de 87 aminoácidos, llamada "caja ciclina". Según su patrón de expresión y actividad se agrupan en 3 categorías: ciclinas de fase G1 (C, D1-3, E1-2, F y G); ciclina A y ciclinas de fase G2 (B1-B2) que se unen y activan a diferentes quinasas (CDK1-9). En la fase G1 se produce un incremento de la expresión de las ciclinas D (D1, D2 y D3), estos tres tipos de ciclina D se expresan de forma específica en diferentes tejidos.²²⁰

Las principales CDKs responsables de la progresión a través de la fase G1 y la entrada en la fase S son CDK2, CDK3, CDK4 y CDK6.^{214,221} Las ciclinas D se unen a

CDK4 y CDK6, la actividad de estas quinasas se detecta a partir de la mitad de G₁ y se incrementa a medida que se acercan a la transición G₁/S.²¹⁴ CDK4 parece ser la principal quinasa dependiente de ciclina implicada en procesos neoplásicos. CDK4 es una diana transcripcional de *c-myc*, ya que contiene 4 lugares de unión altamente conservados en su promotor.²²² De esta manera se establecería una unión directa entre los efectos oncogénicos de *c-myc* y la regulación del ciclo celular.²²²

A medida que la célula progresa a través de la fase G₁ existe un incremento en la expresión de la ciclina E. La ciclina E se une principalmente a la CDK2.²²³ Este complejo está activo hacia el final de G₁ y en la fase S, en la cual también permanecen activos los complejos CDK2-ciclina A. Los complejos CDK2-ciclina E son requeridos para la transición desde G₁ hacia S. El incremento de la expresión de ciclina A ocurre en la transición G₁/S y persiste a través de la fase S.²²³ Con la unión de la ciclina A a CDK2 tiene lugar la síntesis de ADN; en la última parte de la fase S la ciclina A se asocia con CDC2. En la transición G₂/M y en la mitosis se encuentran activos principalmente CDC2-ciclina A y CDC2-ciclina B.²²³

Complejos CDK-ciclinas

Los complejos CDK-ciclina fosforilan diferentes sustratos en las diferentes fases del ciclo celular. El principal sustrato de los complejos constituidos por ciclinas de fase G₁ es la proteína del gen Rb. Rb es un gen supresor de tumores que ejerce su control sobre la proliferación celular a través de la asociación con varias proteínas celulares.²²⁴ La proteína de Rb contiene 16 motivos de reconocimiento de CDKs y es regulada a través de fosforilaciones. Rb inhibe la progresión del ciclo celular cuando se encuentra hipofosforilada, porque en esta

forma secuestra factores necesarios para la transcripción de genes implicados en la progresión hacia la fase S, entre los que se encuentran la familia de factores de transcripción E2F y correpresores como HDACs (*Histone Deacetylases*) y BRG1 (*Brahma-Related Gene-1*), parando a las células en la fase G₁ del ciclo celular y pudiendo iniciar el programa de apoptosis por vías dependientes de p53.²²⁴⁻²²⁶ Este bloqueo es liberado por una creciente fosforilación mediada por las CDKs que se inicia cuando las células en G1 se aproximan al punto R (permitiendo a los factores de transcripción ejercer su regulación transcripcional) y es bruscamente invertido al final de la fase M. Las ciclinas de tipo D y E unidas a CDK2, CDK4 y CDK6 parecen ser los principales complejos implicados en la fosforilación de pRb.^{224,225} (Figura 5).

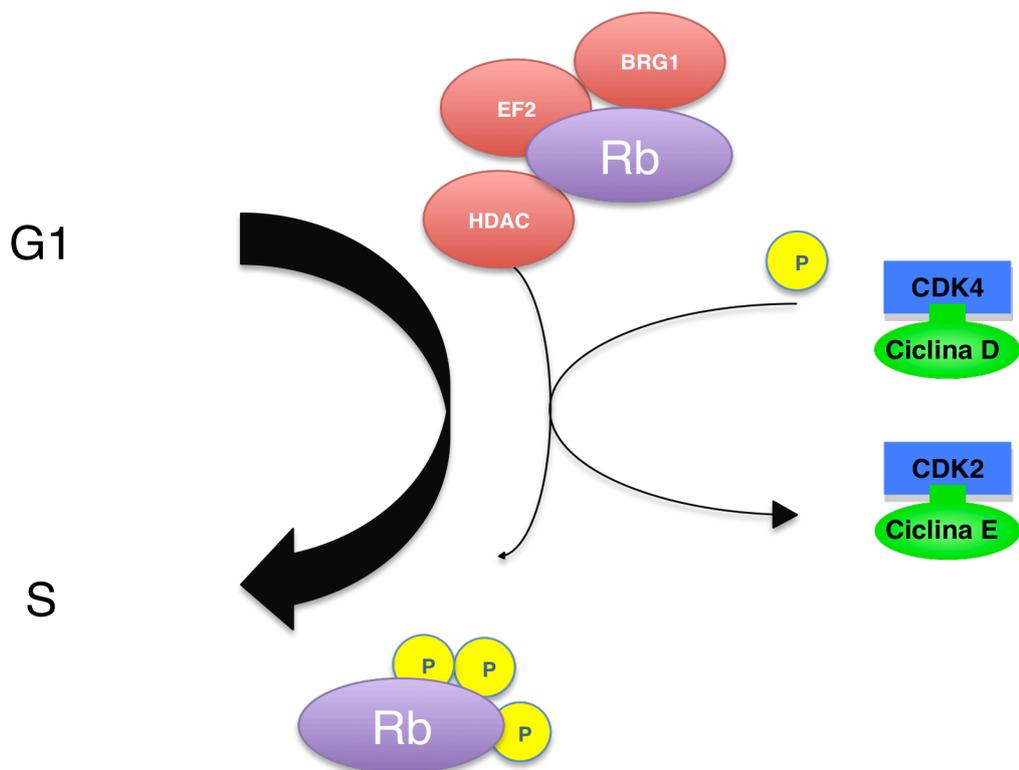


Figura 5: Fosforilación de Rb en la progresión del ciclo celular.

Los niveles de CDKs no parecen variar de forma importante durante el ciclo celular, aunque hay evidencias de que ciertas señales estimuladoras o inhibitoras del crecimiento pueden regular su expresión. Los niveles de las ciclinas son regulados a nivel de su tasa de síntesis y destrucción.²²³

Inhibidores de CDKs

Los inhibidores de CDKs se han agrupado en dos familias, en función a la similitud de sus secuencias, su modo de acción y su especificidad de sustrato. Una de ellas es la familia KIP y la otra la denominada INK4.

Familia KIP

Dentro de la familia KIP se engloban p21/CIP1/WAF1, p27/KIP1 y p57/KIP2.^{227, 228} Los componentes de esta familia comparten un dominio inhibitorio homólogo y son capaces de inhibir todos los complejos CDK-ciclina de la fase G1 y S.

p21 fue una de las primeras proteínas inhibitoras de CDKs identificada. Forma complejos cuaternarios con la mayoría de las CDKs y también con el antígeno de proliferación nuclear (PCNA: *Proliferating Cell Nuclear Antigen*).²²⁵ Al unirse a PCNA puede inhibir su actividad replicativa sin inhibir su capacidad reparadora. p21 protege a las células de la apoptosis parando el ciclo celular e induciendo la reparación del ADN dañado, puede ser activado por p53 y a través de vías independientes de p53.²²⁸ p21 parece tener un efecto protector sobre la leucemogenesis inducida por AML1/ETO.⁶⁴

p27 también interactúa con diferentes complejos CDK-ciclina, siendo el complejo CDK2-ciclina E su principal diana.²²⁵ Existen muchas evidencias de que p27 juega un importante papel en muchos procesos celulares, incluyendo proliferación, diferenciación y apoptosis.²²⁹ Diversos estudios sobre p21 y p27 indican que las alteraciones de estas dos moléculas en procesos tumorales son extremadamente raras o inexistentes.^{228,230} Sin embargo, son fundamentales para la diferenciación mieloide normal.²³¹

p57, al igual que p21, contiene dominios de unión a PCNA y podría estar implicado en la salida de las células del ciclo celular durante el desarrollo y en la diferenciación de algunos tipos celulares.²²⁸

Familia INK4

La familia INK4 está formada por cuatro miembros: p16/INK4a, p15/INK4b, p18/INK4c y p19/INK4d.²²⁷ Son inhibidores específicos de CDK4 y CDK6 y su mecanismo de acción consiste en competir con las ciclinas D por la unión a las CDKs. Algún miembro de esta familia parece capaz de unirse al complejo CDK/ciclina interfiriendo en la acción del complejo sobre sus sustratos. Las proteínas INK4 se caracterizan por tener una regulación post-transcripcional por metilación.²²⁷

La inactivación de p15/INK4b ocurre hasta en el 80% de los pacientes con leucemia aguda mieloblástica, aunque puede no ser fundamental para el desarrollo de la enfermedad,^{232,233} y no parece tener un claro valor pronóstico por sí solo,^{234,235} aunque sí en conjunción con otros genes como ESR1 y IGSF4,²³⁶ o E-cadherina²³⁷ sí podría ser usado como marcador de respuesta en pacientes con terapia basada en fármacos hipometilantes o epigenética.^{76,238}

p16/INKa y p14ARF son dos proteínas codificadas por el mismo gen, debido a un marco de lectura alternativo pero con funciones biológicas parecidas. Las alteraciones de p16/INKa y p14ARF son poco frecuentes en los pacientes diagnosticados de LAM (5%) pero predicen una menor supervivencia global y una mayor probabilidad de recaída sin afectar la tasa de remisiones completas.²³⁹ La pérdida de función de p16/INKa y p14ARF provoca aumento de niveles de MDM2, aunque este no es el único mecanismo que lo produce.²³⁹

p18/INK4c actúa de manera específica sobre CDK6 y débilmente sobre CDK4.²⁴⁰ Sin embargo, parece que su alteración no es muy frecuente en LAM.²³⁴ Por su parte, p19/INK4d presenta una gran homología con p15/INK4b y p16/INK4a. Es capaz de unirse e inhibir tanto a CDK4 como a CDK6, aunque también se han descrito complejos ternarios entre CDK-ciclina y p19/INK4d que son inactivos.²²⁷

p53

p53 es, posiblemente, el gen supresor de tumores mejor conocido y más estudiado. *p53* es una proteína con múltiples funciones que puede actuar a través de vías dependientes o independientes de la transcripción. En situaciones de estrés celular, *p53* puede iniciar la reparación de ADN, está implicado en senescencia y, aunque no es esencial para la progresión del ciclo, puede regular de forma negativa la proliferación celular a través de dos mecanismos: el bloqueo del ciclo celular y la apoptosis.^{226,241-246}

p53 está involucrado en los puntos de control o *checkpoints* de respuesta al daño en el ADN. Su nivel es bajo en células normales, pero se produce un incremento en respuesta a lesiones en el ADN, y la proteína activará la expresión

de genes que mediarán la supresión del crecimiento como p21, GADD45 (*DNA Damage-Inducible Gene-GADD45*) y 14-3-3σ. p53 también activa la expresión de otros genes como *Mdm-2* (*Mouse Double Minute-2*), un oncogén que a su vez regula negativamente la transcripción de p53 y marca a la proteína para su degradación. Entre los diferentes genes modulados por la acción de p53 encontramos también genes implicados en la apoptosis como *Bcl-2* (*B-Cell CLL/Lymphoma-2*) y *Bax* (*Bcl2 Associated-X Protein*).^{226,241-245}

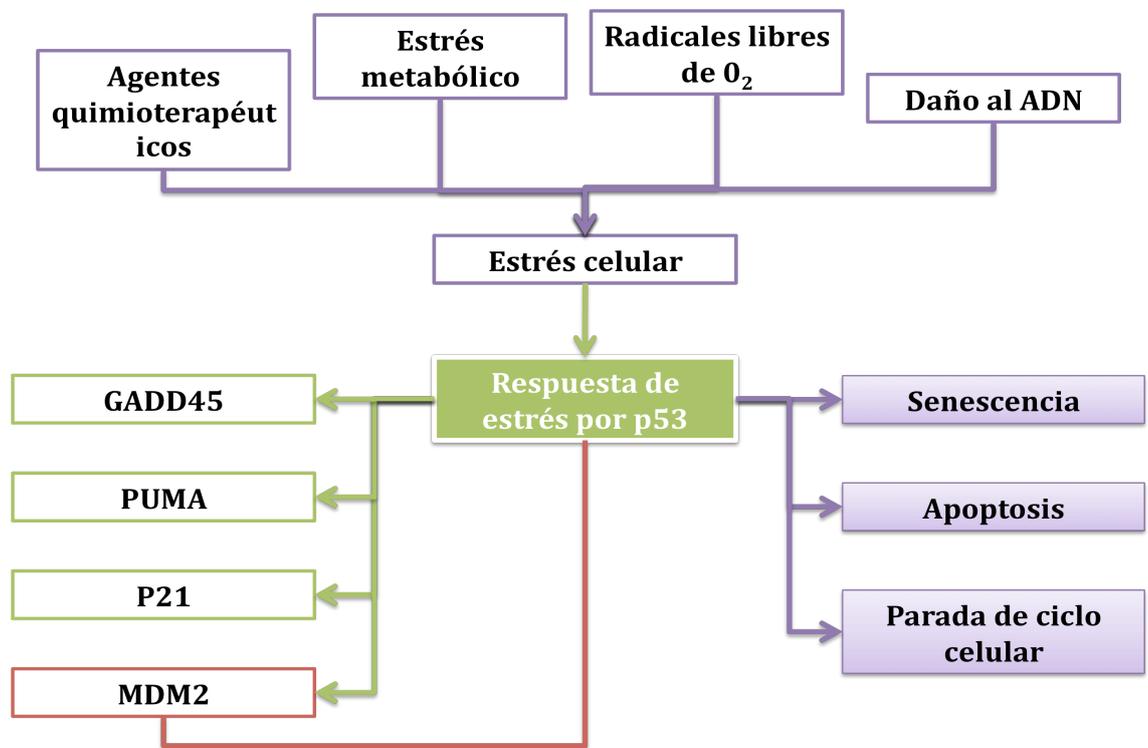


Figura 6: Principales acciones y mediadores de la actividad de p53

Se estima que las mutaciones en la vía de p53 son el suceso genético más frecuente en los tumores humanos, ocurriendo en más del 50% de los casos. Las alteraciones de p53 en LAM de novo suelen ser por delección de un alelo, bien por translocación o bien por delección de 17p, y mutación del otro alelo, fundamentalmente en los exones 4-8. Sin embargo, la inactivación de p53, en

pacientes con LAM se ha definido clásicamente como un hecho raro,^{131, 247-249} siendo más frecuente en LAM secundarias a tratamiento quimioterápico y en pacientes con cariotipos complejos, pero de cualquier manera se asocia con mal pronóstico.²⁵⁰⁻²⁵²

Mecanismos de muerte celular

La muerte celular es un proceso fisiológico, caracterizado por disminución del tamaño celular, formación de vesículas y condensación nuclear necesario para el control de la morfogénesis y organogénesis durante el desarrollo embrionario, y de la homeostasis tisular en organismos adultos.²⁵³ La apoptosis, descrita por primera vez por Kerr ²⁵³ en 1972, es una forma de muerte celular programada, como consecuencia del envejecimiento tisular y celular, o en respuesta a diferentes agentes externos como las radiaciones ionizantes y los agentes quimioterápicos.^{245, 253-259} Puede considerarse como un proceso que facilita la eliminación de células defectuosas, por tanto la alteración en la regulación de los genes implicados en la muerte celular por apoptosis puede ser causa y estar asociada al desarrollo de diferentes neoplasias, enfermedades autoinmunes, infecciones virales y enfermedades neurodegenerativas, entre otras y está implicada en la respuesta a tratamiento de distintas enfermedades neoplásicas.

259-264

A diferencia de la necrosis, o muerte celular accidental, la apoptosis es un proceso activo en el que inicialmente las células reaccionan ante un estímulo ejecutando ellas mismas el proceso de muerte programada.^{254, 265} Durante la apoptosis la célula sufre cambios morfológicos asociados a una disminución de la adhesión y los contactos intercelulares, alteraciones del citoesqueleto, condensación de la cromatina nuclear, desintegración de los nucleolos, disminución del tamaño nuclear, y condensación del citoplasma y orgánulos.²⁶²

Paralelamente se producen una serie de procesos bioquímicos en la célula que incluyen una disminución del potencial de membrana mitocondrial, pérdida de la asimetría en la composición de los fosfolípidos de la membrana plasmática, con la exposición al exterior de residuos de fosfatidilserina y fragmentación del ADN, debido a la activación de endonucleasas dependientes de Ca^{2+} y Mg^{2+} que cortan el ADN genómico por los espacios internucleosomales.²⁶⁶⁻²⁶⁸ Finalmente, se forman fragmentos nucleares recubiertos de membrana (cuerpos apoptóticos) que son fagocitados sin evidencia de reacción inflamatoria.²⁶⁹

A nivel molecular, la apoptosis constituye una serie compleja de eventos con múltiples reguladores tanto positivos como negativos e integrada en otras vías intracelulares tan importantes como la progresión en ciclo celular, las señales mediadas por fosforilación y la reparación de daño al ADN.^{177, 270-272} Actualmente se cree que la apoptosis se lleva a cabo principalmente por dos vías distintas.^{254, 260, 263, 273, 274} Estas dos vías alternativas de inducción de apoptosis se dividen en: 1) Apoptosis mediada por receptores de muerte expresados en la superficie celular o vía extrínseca; y 2) Apoptosis mediada por la mitocondria o vía intrínseca. La señalización por ambas vías induce la activación de miembros de una familia de proteínas conocidas como caspasas (*Caspases: Cysteine Aspartate-specific Proteases*),²⁶³ que de forma específica cortan proteínas en los residuos de cisteína localizados próximos al ácido aspártico.²⁶³ Las caspasas iniciadoras dan comienzo una cascada de eventos que convergen dentro de una vía común de caspasas efectoras que conducen a la ejecución de la apoptosis, y que se traduce en los cambios bioquímicos y morfológicos característicos de este fenómeno descritos anteriormente. Además, la vía intrínseca induce también muerte celular a través de una vía independiente de caspasas.^{254,263}

La deregulación del complejo equilibrio entre proliferación y supervivencia y muerte celular juega un papel importante en el desarrollo del cáncer, incluyendo las LAM. En este sentido, la resistencia a la apoptosis es una de las seis alteraciones esenciales en la fisiología celular que dicta el crecimiento de las células tumorales y es uno de los hechos distintivos de prácticamente todos los cánceres.²⁷⁵ En el caso de las LAM, el estudio de las alteraciones en la apoptosis, ligado a los mecanismos patogénéticos, ha sufrido un avance importante en los últimos años y, además, puede transformarse en nuevas vías terapéuticas para estos pacientes. Por ejemplo, es conocido que las proteínas de fusión pueden interactuar con los mediadores de la apoptosis enviando señales antiapoptóticas que favorezcan la supervivencia de las células leucémicas, así en la inv(16) se altera la vía de p53,²⁷⁶ en t(8;21) se aumentan los niveles de BCL2,⁶⁶ las alteraciones de 11q23 pueden inhibir la apoptosis alterando la expresión de varios genes.²⁷⁷ Las mutaciones puntuales que afectan a Nucleofosmina se asocian un mejor pronóstico dentro del grupo de LAM-CN a pesar de favorecer un estado antiapoptótico. La nucleofosmina puede actuar en situaciones de estrés como un regulador negativo de p53 para proteger a las células de la apoptosis, mientras que ante otros estímulos favorece fenómenos de senescencia.²⁷⁸ La nucleofosmina mutada puede perturbar las acciones proapoptóticas de p53 y proteger a las células de la apoptosis.²⁷⁹⁻²⁸¹ Las mutaciones de FLT3 provocan una activación constitutiva de MAPK, Akt y STAT5 que conlleva activación de Pim-1 e hiperexpresión de BCL-XL.^{282, 283} Además de los ensayos clásicos, los estudios de expresión génica han diferenciado varios grupos de perfiles de expresión con implicaciones pronósticas en pacientes con LAM en función de la expresión de genes implicados en apoptosis, proliferación y resistencia a fármacos.²⁸⁴⁻²⁸⁷

Además, de mecanismo patogénético, la deregulación de la apoptosis puede ser una de las causas de la disminución de la sensibilidad de las células tumorales a los quimioterápicos que ejercen su efecto anti-tumoral a través de la inducción de apoptosis.^{288, 289} La inducción de apoptosis por quimioterapia está asociada con la activación de genes pro-apoptóticos y la supresión de genes anti-apoptóticos, mientras que la atenuación de los genes pro-apoptóticos y el incremento de los genes anti-apoptóticos causa resistencia. Aunque son cada vez más numerosos los genes identificados que participan en la regulación, iniciación y ejecución de la apoptosis, y sus correspondientes proteínas, en esta introducción nos centraremos de forma específica en algunas proteínas, que intervienen en la regulación de la apoptosis a través de la vía extrínseca y de la vía intrínseca que incluye la apoptosis dependiente e independiente de caspasas.²⁶³

Vía extrínseca: Receptores de muerte

La vía extrínseca es activada por los ligandos de la familia del TNF- α que al unirse a sus receptores desencadenan la activación de caspasas y la apoptosis.²⁶³ Los receptores de muerte se caracterizan por tener dominios extracelulares ricos en cisteína. Todos tienen en común un dominio DD (*Death Domain*) en la región citoplasmática. De forma general, la unión de ligandos a los receptores de muerte induce su trimerización, y posteriormente los dominios DD reclutan moléculas adaptadoras que posteriormente activarán a la Caspasa-8 y ésta, al ser activada, activará a su vez la Caspasa-3.²⁶³ Los receptores de muerte mejor estudiados son Fas (Apo-1 o CD95), TNF-R (*Tumor Necrosis Factor Receptor*) y TRAIL-R (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor*).²⁹⁰⁻²⁹³

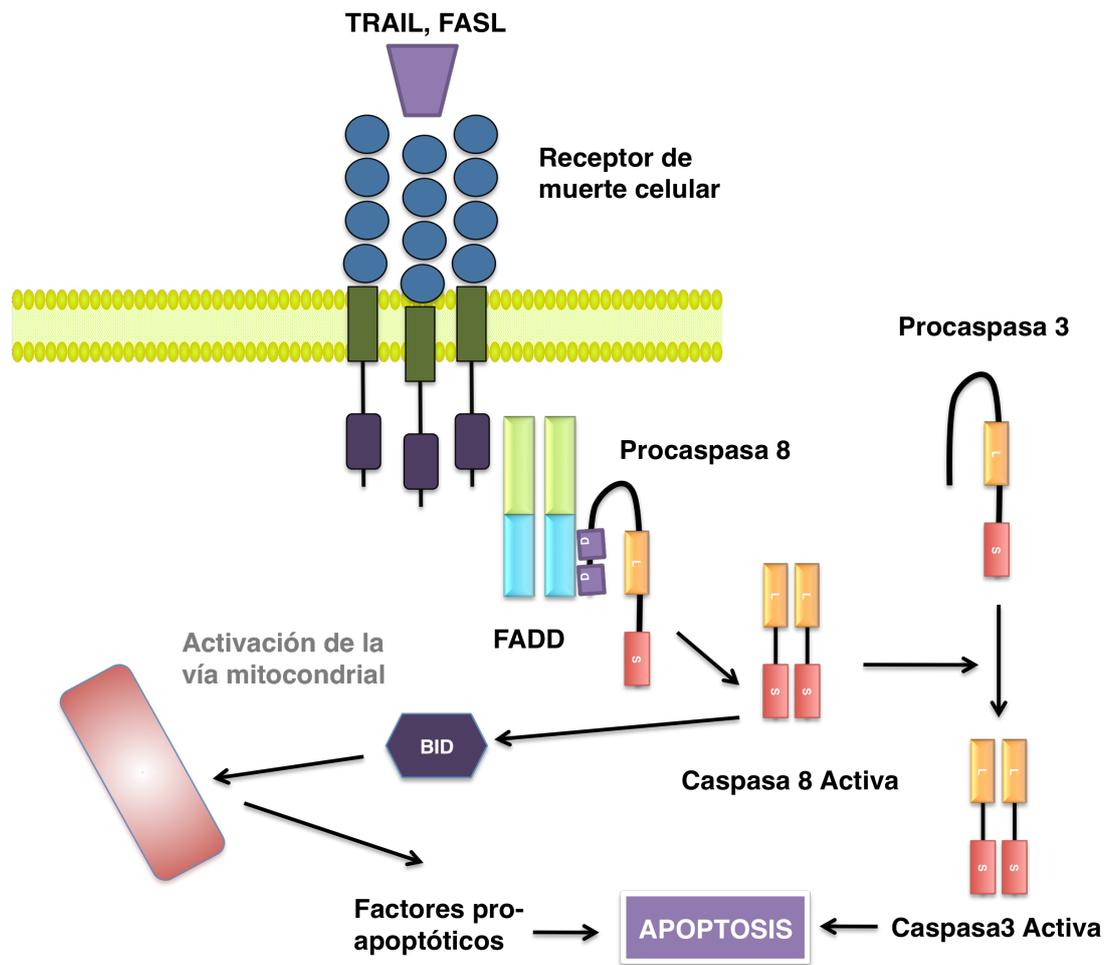


Figura 7: Esquema de las señales apoptóticas de la vía extrínseca (mediada por receptores de muerte celular). Al unirse el ligando al receptor de muerte, FADD activa la procaspasa 8, que a su vez actúa sobre las caspasas efectoras. Simultáneamente, la caspasa 8 activa, puede inducir la activación de BID, activando la vía mitocondrial.

Fas

Fas/Apo-1/CD95 se expresa de forma ubicua en la superficie de la célula, es una proteína de membrana de 40 KDa, que está altamente expresada en linfocitos T y células NK (*Natural Killer*) activadas.²⁹⁰⁻²⁹² El sistema Fas/FasL participa en la eliminación de los linfocitos T y B, de células infectadas por virus y de células cancerígenas. Esta vía se inicia por la formación del complejo DISC (*Death-Inducing Signalling Complex*) en el cual interviene una molécula adaptadora llamada FADD

(*Fas Associated Death Domain*) y la procaspasa-8. FADD se une a Fas mediante sus respectivos dominios DD y a la procaspasa-8 mediante un dominio DED (*Death Effector Domain*). La oligomerización de la procaspasa-8 en el complejo DISC da lugar a la activación de la Caspasa-8 y la posterior activación de otras caspasas. Dependiendo del tipo celular, la Caspasa-8 puede directamente activar a la Caspasa-3 o proteolizar el extremo carboxi-terminal de Bid (*BH3 Interacting Domain Death Agonist*), una proteína proapoptótica de la familia de Bcl-2. La translocación de la forma truncada de Bid a la mitocondria activará la vía mitocondrial²⁹⁰ (Figura X). Se ha descrito que esta vía participa en la muerte inducida por algunas drogas citotóxicas como son la doxorubicina y el metotrexato.²⁹⁴

TNFR

Al igual que Fas, el receptor de tipo 1 para el TNF- α (TNFR1) se expresa de forma ubicua, en cambio su ligando TNF- α sólo se expresa en macrófagos activados y en linfocitos en respuesta a infecciones.²⁹⁰ En la activación, TNF, se une a su receptor mediante trimerización de TNFR1. Posteriormente se une una molécula adaptadora TRADD (*TNFR-associated death domain protein*) que induce la asociación con FADD y la activación de la Caspasa-8. Además de la vía apoptótica, TNF induce otras vías de transducción de señales a partir de TRADD que desencadenan la activación de NF- κ B y JNK (*c-Jun Kinase*)/Ap-1.²⁹⁰ (Figura 5) La demostración de que TNF- α podía eliminar selectivamente las células tumorales respetando las células sanas rápidamente llevó al optimismo, sin embargo, dadas las potentes capacidades inflamatorias del TNF- α , la administración sistémica no era tolerada²⁹⁵

Receptores TRAIL

Las células normales expresan TRAIL (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*), pero son resistentes a la muerte celular inducida por TRAIL, en cambio las células tumorales son sensibles a esta citocina.²⁹⁰ Se han descrito cuatro receptores de los cuales dos (TRAIL-R1 o DR4 y TRAIL-R2 o DR5) inducen apoptosis y serán los que determinaran si una célula será resistente o sensible a TRAIL.^{290, 296} Estudios iniciales sugieron que la terapia con TRAIL puede ser una de las estrategias en el futuro, aunque no de forma individual, al menos en LAM por la alta expresión de TRAIL-R3 y TRAIL-R4,²⁹⁶ pero sí combinada con drogas; en este sentido, en experimentos *in vitro* y *ex-vivo* se ha demostrado sinergismo con otros nuevos tratamientos para LAM.²⁹⁷⁻²⁹⁹

Caspasas

Las caspasas se sintetizan en forma de precursores inactivos (zimógenos) de 30-50 KDa que presentan tres dominios: un dominio amino-terminal (prodominio), un dominio que dará lugar a una subunidad grande y otro dominio que dará lugar a una subunidad menor.²⁶³ En presencia de estímulos apropiados, hay un proceso de proteólisis en residuos conservados de cisteína próximos a residuos ácido aspártico entre los dominios, generándose los fragmentos activos. Basándonos en el nivel de la cascada apoptótica donde ejercen su acción podemos dividir a las caspasas en dos grupos: las caspasas iniciadoras (Caspasas 2, 8, 9 y 10) que son activadas en respuesta a señales de estrés o daño celular durante el inicio del proceso de apoptosis y que proteolizan y activan a las caspasas efectoras o ejecutoras (Caspasas 3, 6 y 7), éstas, una vez activadas, serán las responsables de la proteólisis directa de un amplio espectro

de proteínas celulares que, últimamente, darán lugar a la muerte de la célula. Uno de los primeros sustratos identificados fue PARP (*Poly (ADP-Ribose) Polymerase*).²⁶³

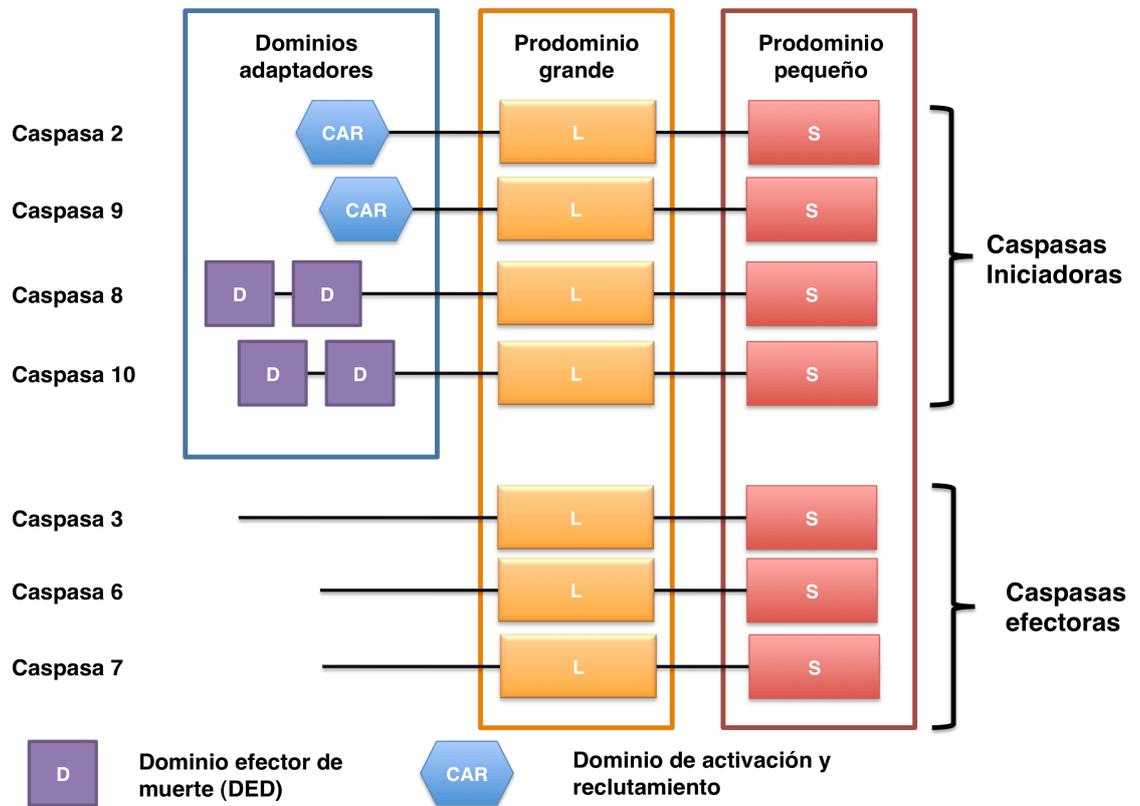


Figura 8: Estructura esquemática de las caspasas. De acuerdo con su función, las caspasas pueden ser divididas en tres grupos: Caspasas implicadas en el inicio de la señal de muerte celular, caspasas implicadas en la ejecución de la muerte celular y caspasas implicadas en respuestas inflamatorias (no mostradas).

Las caspasas iniciadoras presentan en su región N-terminal uno o dos dominios adaptadores que son esenciales para su función. En cambio, las caspasas efectoras no presentan dichos dominios. Existen dos vías fundamentales por las cuales las caspasas pueden ser activadas (vía intrínseca y vía extrínseca de la apoptosis dependiente de caspasas) pero, aunque ambas vías convergen en las caspasas efectoras, requieren distintas caspasas para iniciar el proceso. Así, la activación de la vía extrínseca provoca fundamentalmente reclutamiento de

caspasa 8 y la vía intrínseca provoca fundamentalmente reclutamiento de caspasa 9.²⁶³

Los niveles de caspasa 3 han sido estudiados en LAM mediante técnica de Western Blot, con resultados interesantes. Los niveles altos de pro-caspasa 3 se han relacionado con mal pronóstico en LAM *de novo*, hecho que podría ser debido a una resistencia a la apoptosis, que provocaría falta de procesamiento de caspasa 3, lo que llevaría a su acumulación en el citoplasma, mientras que los pacientes que presentaban caspasa 3 procesada de forma espontánea al diagnóstico presentaban mejor supervivencia.³⁰⁰

IAPs, las proteínas inhibidoras de caspasas

Las proteínas denominadas IAPs (*Inhibitors of Apoptosis Proteins*), tienen la capacidad de inhibir la apoptosis mediante la unión selectiva e inhibición de la actividad de caspasa 3, 7 y 8, pero no caspasa 8. Los IAPs bloquean la cascada de caspasa e inhiben la muerte celular en respuesta a estímulos proapoptóticos.³⁰¹ Actualmente hay 8 miembros de esta familia, pero dos de ellos, Survivina y XIAP (*X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein*) han recibido especial atención.

XIAP es posiblemente la IAP mejor estudiada tanto a nivel estructural como a nivel mecánico.³⁰² Además, XIAP es el único miembro de esta familia que puede inhibir tanto las caspasas efectoras como las iniciadoras. XIAP está frecuentemente elevada en células tumorales, provocando resistencia a quimioterapia.³⁰³ XIAP, por lo tanto, es una buena diana terapéutica, en base a sus funciones, además, la inhibición de XIAP restaura la quimiosensibilidad de las células.^{304,305}

La survivina es la única IAP que se asocia al huso mitótico.³⁰⁶ Su expresión es ciclo dependiente.^{307,308} Tiene una función doble, inhibe la apoptosis mediante

su interacción directa e indirecta con las caspasas y regula el ciclo celular.³⁰⁹ La survivina se expresa en tejido embrionario y se halla sobreexpresada en células tumorales, asociándose con la resistencia a la quimioterapia, pero no en tejidos adultos normales.^{303,309}

Vía intrínseca: La mitocondria

La vía de muerte mitocondrial se observa en respuesta a agentes oxidantes, drogas y factores de crecimiento. Inicialmente, la mitocondria se consideró un elemento pasivo en la muerte celular por apoptosis, que sólo reflejaba daños en las funciones críticas debido a la muerte celular. Pero, el hecho de que Bcl-2 se hallara en la membrana mitocondrial externa sugirió que la mitocondria podía tener una función especial en la apoptosis.³¹⁰

Apoptosis dependiente de caspasas

Familia de Bcl-2.

Las proteínas de la familia de Bcl-2 contienen por lo menos uno de los dominios conservados, conocidos como *Bcl-2 homology domains* (BH1-BH4) y se clasifican en base a su función y estructura en 1) Proteínas antiapoptóticas, que contienen los dominios BH1 y BH2, 2) Proteínas proapoptóticas que contienen los dominios BH1, BH2 y BH3, y 3) Proteínas proapoptóticas que contienen únicamente el dominio BH3.^{256, 257, 262, 311, 312} El dominio BH3 es esencial para la actividad apoptótica. Dentro del primer grupo de proteínas que inhiben la apoptosis y/o promueven la supervivencia celular se incluyen Bcl-2, Bcl-X y Mcl-1, entre otras, y se localizan en la membrana mitocondrial externa. Dentro de los miembros de la familia de Bcl-2 que inducen apoptosis, con homología restringida al dominio BH3, se agrupan las proteínas Bim (*Bcl2-Interacting Protein*

BIM), *Bad*, *Bid* y *Bnip3* (*BCL2* adenovirus *E1B* 19kDa-interacting protein 1 *NIP3*), además de las proteínas *Bax* y *Bak* (*Bcl2* Antagonist *Killer*); se localizan principalmente en el citosol y en respuesta a estímulos apoptóticos se traslocan a la mitocondria (Figura XX). Los cambios de localización pueden ser debidos a cambios de conformación u oligomerización, como ocurre con la proteína *Bax*, a cambios en su estado de fosforilación descrito en la proteína *Bad* o por proteólisis como ocurre en la proteína *Bid*. Muchas de estas proteínas interactúan entre ellas formando una red compleja que determina una mayor o menor susceptibilidad para la activación o la inhibición de la puesta en marcha de la vía intrínseca de la apoptosis.^{311,313}

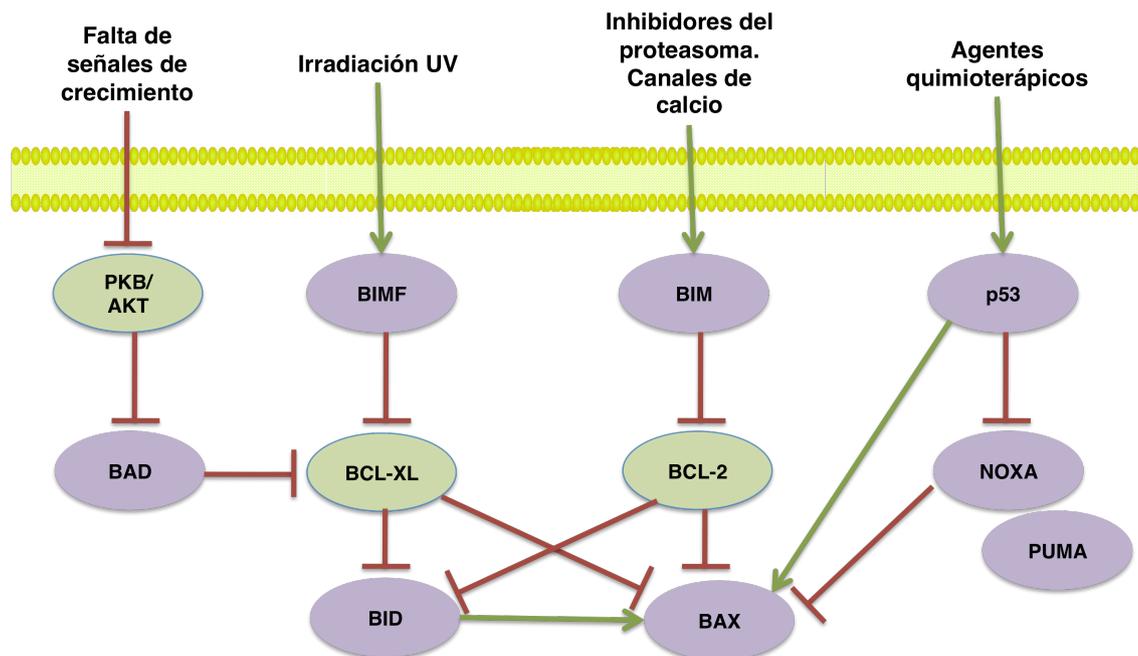


Figura 9: Señales activadoras de la vía mitocondrial de la apoptosis.

La expresión del oncogen *Bcl-2* desempeña un papel importante en las neoplasias linfoides de línea B.³¹³ La translocación t(14;18)(q32;q21) da lugar a una expresión anormalmente aumentada de la proteína *Bcl-2*, que conduce a la inhibición de la muerte celular, contribuyendo a incrementar la supervivencia de

las células B y así perpetuar el proceso neoplásico.³¹³ La sobreexpresión de la proteína BCL2 resulta en la resistencia a una amplia variedad de estímulos proapoptóticos como los quimioterápicos,^{312,314} lo que se ha traducido en peores tasas de remisión en los pacientes afectados de LAM ³¹⁴⁻³¹⁷ La ratio entre Bax (proapoptótico) y BCL2 (antiapoptótico) medidos por citometría de flujo en pacientes con LAM tiene un alto poder predictivo para la remisión completa, la supervivencia global y la tasa de recaídas.³¹⁸ Las poblaciones CD34+ de las leucemias agudas mieloblásticas son más resistentes a la apoptosis que las poblaciones CD34- y esto está debido principalmente a una mayor expresión de BCL-2, BCL-XL y MCL-1 y una menor expresión de Bax.^{319, 320} El aumento de la expresión de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y BCL-XL bloquea la apoptosis inducida por la doxorubicina.³²¹

BCL-XL está frecuentemente elevado en células blásticas CD34+ y contribuye a la quimioresistencia de esta población.³²² Este hecho no es sorprendente, ya que BCL-XL es una diana de STAT5,³²³ y de FLT3 tanto por *internal tandem duplication* como por mutación en dominio tirosin kinasa (vehiculado por STAT5).^{282,324} Además de lo anterior FLT3-ITD provoca fosforilación de BAD.³²⁵

Mcl-1 no tiene un papel tan claro como Bcl-2 en las LAM, ya que sus niveles no parecen guardar relación con la respuesta a tratamiento, si bien, parece que estos aumentan en la recaída.^{326,327}

Citocromo-C.

Es una proteína que participa en la cadena de transporte de electrones y se encuentra en el espacio intermembranal de la mitocondria. Cuando es liberada al citosol se une a la proteína APAF-1 (*Apoptotic Protease Activating Factor-1*) y a la

procaspasa-9, formando el complejo llamado apoptosoma, induciendo la activación de la Caspasa-9 y la cascada de activación de caspasas,^{263,328} (Figura XX). Los defectos en la formación del apoptosoma son un fenómeno poco estudiado, en muestras de líneas celulares de LAM y el experimentos ex vivo, se ha demostrado que los niveles de APAF son bajos en una proporción elevada de pacientes, y que su patrón de expresión se correlaciona con la inducción de apoptosis.³²⁹ Esta baja expresión es debida en parte a metilación anormal de su promotor, ya que APAF-1 se reexpresa con tratamiento con 5-aza-2´deoxycitidina,³³⁰ pero otros mecanismos post-traduccionales deben de regular la expresión de APAF ya que existe poca relación entre los niveles de mRNA y de proteína.³³¹

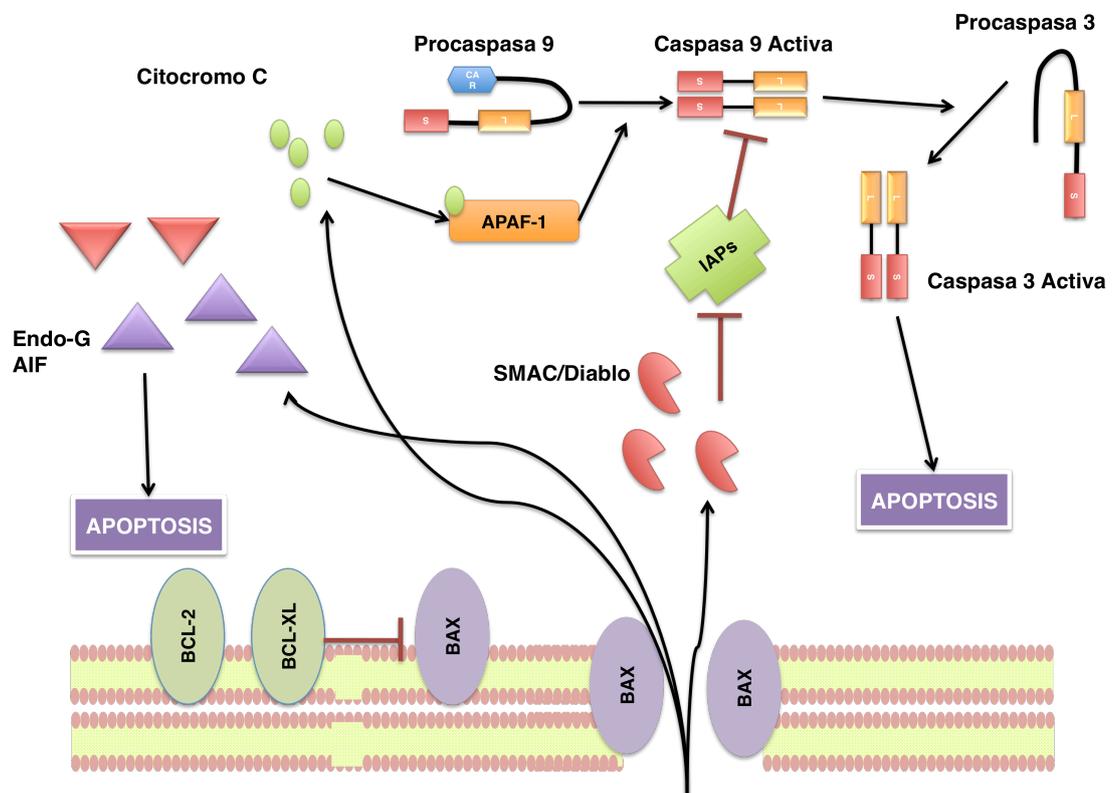


Figura 10: Vía mitocondrial de la apoptosis.

Smac/Diablo.

Smac/Diablo (*Second Mitochondria-derived Activator of Caspase*) se une por su extremo N terminal a la mitocondria y en el espacio intermembranal se proteoliza dejando libre el dominio que le permite su unión con las IAPs.^{310,332} Debido a la pérdida del potencial mitocondrial, y al mismo tiempo que se produce la liberación de Citocromo-C, se libera *Smac/Diablo* que se une a las IAPs (XIAP, c-IAP1, c-IAP2, y survivina) en el citoplasma y las bloquea, inhibiendo su función y potenciando la activación de caspasas y la vía de apoptosis mitocondrial.³³³ La liberación de *Smac/Diablo* es inhibida por Bcl-2 y Bcl-xL³³⁴ (Figura 6).

Apoptosis independiente de caspasas

Como acabamos de describir, la pérdida de potencial mitocondrial, aumenta la permeabilidad de la membrana mitocondrial y el resultado es la liberación de pequeñas moléculas como Citocromo-C y *Smac/Diablo* que activan la vía dependiente de caspasas. Pero además de estas proteínas, también se liberan otras moléculas como AIF (*Apoptosis-inducing factor*) y Endonucleasa G (Endo-G) que activan una vía de apoptosis independiente de caspasas.^{263,328,335}

AIF (Apoptosis inducing factor).

AIF es una proteína altamente conservada filogenéticamente, esencial para el desarrollo embrionario. Como *Smac*, se sintetiza en forma de precursor inmaduro,³³⁶ se trasloca a la mitocondria y en el espacio intermembranal se proteoliza, la forma madura tiene actividad oxidasa.^{337, 338} En respuesta a señales de muerte, AIF sale de la mitocondria se traslada a través del citosol hasta el núcleo dónde se une al ADN provocando condensación de la cromatina y fragmentación de ADN en fragmentos de aproximadamente 50 Kb (Figura 7).³³⁶

Endonucleasa G.

Endo-G, es una proteína esencial para la replicación del ADN mitocondrial. Se aisló a partir de la fracción mitocondrial tratada con la forma activa proapoptótica de Bid: tBid.^{339,340} Una vez liberada al citosol se traslada al núcleo dónde fragmenta ADN, incluso en presencia de inhibidores de caspasas.³³⁹ (Figura 10). Endo-G coopera con la exonucleasa y ADNasa facilitando el procesamiento de ADN.

Daño y reparación del ADN

El genoma está sujeto a varios tipos de daño al ADN por agentes exógenos (radiación, citotóxicos,...) o endógeno (radicales libres, recombinación,..) La capacidad de reparar el daño al ADN es vital para mantener la integridad del genoma, y por tanto, la viabilidad celular. De esta forma, las células presentan mecanismos altamente conservados, llamados en su conjunto Respuesta al daño al ADN (*DNA-damage repair*, DDR), para detectar las lesiones al genoma, señalarlas y proceder a su reparación.³⁴¹ Aunque las respuestas difieren para distintos tipos de daño, siguen un patrón general, en el que múltiples procesos actúan de forma cooperativa y comparten efectores.

Mecanismos de reparación del daño al DNA

Dado que existe una variabilidad en las distintas formas en que se puede producir daño al ADN, existen múltiples mecanismos de reparación. El estudio de la secuencia exacta de la reparación del daño al ADN es difícil, dado que muchos eventos tienen escasa separación temporal u ocurren simultáneamente.

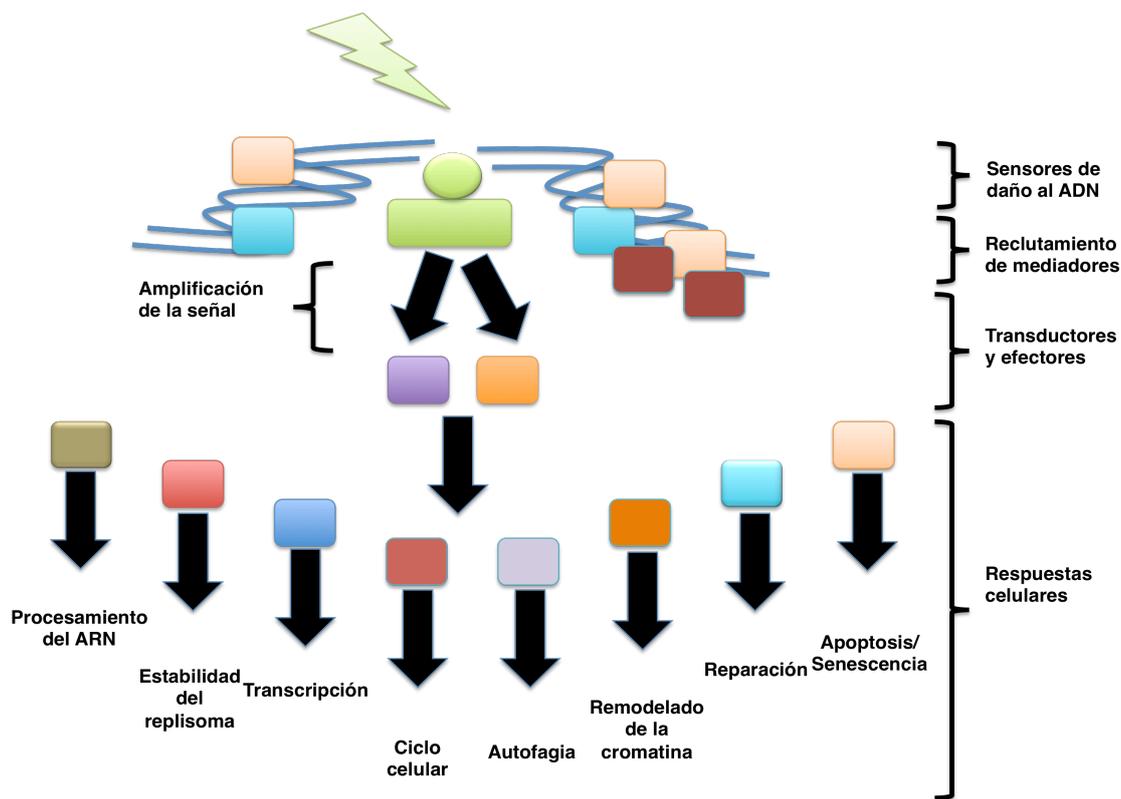


Figura 11: La presencia del daño al ADN es reconocida por una serie de proteínas que inician cascadas de transducción de señales que tienen impacto en un serie de procesos celulares.

De forma resumida, los mecanismos de reparación del daño al ADN podemos encontrarlos en la tabla 2 y los podemos catalogar en:

Mecanismo de DDR	Lesiones en las que actúa	Componentes principales
Reversión directa	O ⁶ alquilguanina	O6-metilguanine methyltransferasa
MMR	Falta de complementariedad en el ADN y horquillas de inserción o deleción durante la replicación	Sensores: MSH2–MSH6 y MSH2–MSH3 junto con MLH1–PMS2, MLH1–PMS1, PLH1–MLH3, EXO1, polimerasas δ y ϵ , PCNA, RFC, RPA, ligasa I
BER y SSB	Bases anormales de ADN, pérdida de bases aisladas, SSB generadas daño oxidativo al ADN o inhibición de la topoisomerasa	ADN glicosilasas (sensores), APE1 endonucleasa, ADN polimerasas (β , δ y ϵ) y factores asociados, flap endonucleasa FEN1, ligasa I o ligasa III. SSB puede precisar la actividad liasa de la polimerasa β , XRCC1, PARP1, PARP2, y aprataxin.

Mecanismo de DDR	Lesiones en las que actúa	Componentes principales
NER	Lesiones que desestructuran la doble hélice	Sensores: ARN polymerase, XPC-HR23B y DDB1/2, y XPA, XPE, XPF/ERCC1, XPG, CSA, CSB, TFIIH, ADN polimerasas incluyendo κ y factores asociados, PCNA, RPA, ligasa I y III
NHEJ	Roturas de doble hebra	Sensores: Ku y DNA-PKcs junto con XRCC4, XLF/Cernunnos y ligase IV. También usa el complejo MRE11–RAD50–NBS1, Artemis nucleasa, polinucleotido kinasa, aprataxin and polymerases μ and λ .
HR	Recombinación homóloga	RAD51, proteínas reacionadas con RAD51(XRCC2, XRCC3, RAD51B, RAD51C, RAD51D, DMC1), RAD52, RAD54, BRCA2, RPA, FEN1, ADN polimerasa y factores asociados. Promovida por MRN, CtIP, BRCA1 y la vía de ATM.
Complejo de Anemia de Fanconia	Uniones entre las dos hebras	ANCA, FANCC, FANCD1/BRCA2, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, FANCI, FANCI, FANCL, FANCM, FANCN, PALB2 y otros factores implicados en la HR
Señales mediadas por ATM	Roturas de doble hebra	ATM, MRN y CHK2. Promovida por mediadores como MDC1, 53BP1 MCPH1/BRIT1, y por ubiquitin ligasas RNF8, RNF168/RIDDLIN y BRCA1
Señales mediadas por ATR	ADN monocatenario y roturas de doble hebra	Sensores: ATR, ATRIP y RPA y el complejo RAD9–RAD1–HUS1 (9-1-1). RAD17 (RFC1-like) y CHK1. Promovida por MRN, CtIP y proteínas mediadoras como TOPBP1, Claspin, MCPH1/BRIT1 and BRCA1.

Tabla 2: Principales mecanismos y componentes de reparación del daño al ADN.

Reversión

Es capaz de eliminar daño al ADN revirtiéndolo químicamente, sin necesidad de una hebra molde, por ejemplo, resolución de dímeros de bases pirimidínicas tras el daño por UV mediante la actividad photolyasa.

Daño a una hebra única de ADN

Cuando sólo una hebra del ADN está dañada, la otra hebra puede ser usada como molde par su reparación.

Reparación por excisión de bases (Base excision repair, BER).

Es capaz de reparar el daño por oxidación, alquilación, hidrólisis o demidación de una única base. El encima ADN glicosilasa la base dañada y la ADN polimerasa resintetiza el nucleótido que falta y una ADN ligasa mantiene la continuidad de la cadena.³⁴²

Reparación por excisión de nucleóticos (Nucleotide excision repair, NER).

Reconoce daño al ADN que distorsiona la arquitectura de la doble hélice. Este mecanismo se desdobra en dos distintos según el método para reconocer la lesión, bien sea acoplado o no a la transcripción. En la reparación por NER, se forma un ADN monocatenario de 22-30 pares de bases sobre el cual actúan las ADN polimerasas y posteriormente la ligasa.³⁴³

Mismatch repair (MMR)

Corrige daño en la replicación y recombinación debido a la no complementariedad de bases, por lo que se produce una eliminación del nucleótido por acción de una nucleasa y posteriormente una ADN polimerasa y una ligasa.³⁴⁴

Daño a la doble hebra del ADN

Las roturas de la hebra de ADN son las formas más citotóxicas de daño al ADN. De forma general, podemos considerar dos tipos de roturas: roturas de doble hebra (*double strand breaks, DSBs*) o roturas de hebra sencilla (*single strand breaks, SSBs*).

Las roturas de doble hebra son generadas de forma natural cuando las horquillas de replicación se encuentran con lesiones que bloquean su avance y provocan su colapso como ocurre, por ejemplo con el daño por radicales libres de

oxígeno, y también cuando las células son expuestas a agentes que dañan el ADN como la radiación ionizante o agentes que promueven la generación de radicales libres de oxígeno, lesiones que bloquean el avance de las horquillas de replicación como los agentes alquilantes o agentes que provocan crosslinks, o fármacos que inhiben la topoisomerasa. La incapacidad de reparar estos daño puede provocar muerte celular o cambios a gran escala en los cromosomas (deleciones, translocaciones, fusiones), lo que llevará a la inestabilidad genómica. Las células eucariotas reparan las DSBs por medio de dos mecanismos principales: *Non-homologous end joining* (NHEJ) y *Recombinación homóloga* (*Homologous recombination*, HR).³⁴⁵ El motivo por el cual una célula decide una vía u otra de reparación excede los objetivos de esta revisión, pero puede ser consultado en el artículo de Shrivastav et al.³⁴¹

NHEJ

El mecanismo de reparación NHEJ puede actuar en cualquier fase del ciclo celular. Aunque clásicamente se han descrito como un mecanismo tendente al error, esto es una sobresimplificación,³⁴⁶ ya que una parte hasta el 50% de las DSBs pueden ser reparadas por NHEJ de forma precisa, y una parte importante también mediante alineamiento de unos pares de bases con cierto grado de homología, lo que puede llevar a pequeñas inserciones y deleciones. En este mecanismo, las roturas de doble hebra son reconocidas por la proteína Ku, que se une y activa las proteína-kinasas DNA-PKcs, que reclutan polimerasas, ADN ligasa IV y otros enzimas para reparar la rotura

HR

La recombinación homóloga se considera más precisa ya que se usan secuencias homólogas en otro lugar del genoma (cromátida hermana, regiones homólogas en el mismo u otro cromosoma) como molde para la reparación, por lo que sólo puede actuar en fase de síntesis y G2. De esta forma, si la "plantilla" es perfectamente homóloga, la reparación puede ser totalmente precisa. Con la excepción del uso de una cromátida hermana, la HR puede desencadenar en una pérdida de heterocigosidad o disomía uniparental.

En estos procesos, existen múltiples proteínas y complejos proteicos implicados, con varias vías posibles, aunque como normal la recombinación homóloga se inicia con la generación de un ADN monocatenario. La formación de este ADN monocatenario está iniciada por la actividad del complejo MRN. El complejo MRN es un grupo de proteínas con actividad quinasa que es fundamental en la fase precoz del daño al ADN. Estas funciones incluyen además de la reparación de roturas de doble hebra del ADN, el mantenimiento de los telómeros y, durante la replicación, resolución de horquillas y estructuras estancadas.^{347,348} En el modelo actual de resolución de DSBs, MRN, posiblemente, en asociación con otros complejos como SOSS, es reclutado hacia los sitios de daño al ADN. A través de MRE11, se une a los extremos libres de la hebra de ADN y, mediante enlaces de Zn^{2+} e interacciones Rad50-Rad50 forma puentes entre los fragmentos del cromosoma. A través de MBS1, se recluta la ATM en su forma inactiva. Mientras tanto, en los extremos del ADN, los complejos MRN, junto con Sae2/CtIP, procesan los extremos (desenrollamiento, resección de fragmentos, resección de horquillas,...), para formar un producto intermedio con pequeños

fragmentos de ADN monocatenario, sobre el que actuarán otras proteínas como helicasas, DNAsas, o RPA.

ATM y ATR son dos proteínas clave en la señalización de las roturas de doble hebra que son reclutadas y activadas en los focos de rotura. En esa situación, actúan sobre unas 700 proteínas distintas, principalmente implicadas en reparación del daño al ADN y muy interconectadas entre sí,³⁴⁹ como el complejo MRN,³⁵⁰ NBN (*Nibrin*),³⁵¹ H2AX,³⁵² MDC1 (*mediator of DNA damage checkpoint 1*),³⁵³ BRCA1,³⁵⁴ SMC1 (*structural maintenance of chromosome 1*),³⁵⁵ p53,³⁵⁶ RPA (*replication protein A*),³⁵⁷ FANCD2 (Fanconi anemia complementation group D2 isoform),^{358,359} y otras. Además del efecto directo sobre otras proteínas, las señales inducidas por ATM y ATR promueven la expresión y activación de otras proteínas implicadas en la reparación del ADN modulando cambios como fosforilación, acetilación, ubiquitilación o SUMOilación.

Dos de las proteínas activadas por ATM y ATR mejor estudiadas son CHK1 y CHK2 (*checkpoint kinase 1 y 2*).^{356,360} CHK1 y CHK2, junto con ATM y ATR ejercen un efecto de parada del ciclo celular al actuar sobre distintas ciclinas dependientes de kinasas (CDKs) por vías dependientes de p53 y por vías independientes de p53. La fosforilación de CHK1 se ha documentado *in vitro* en líneas celulares de leucemia aguda mieloblástica en respuesta a tratamientos que inducen daño al ADN.³⁶¹

La forma activa de ATM fosforila a la histona 2AX (γ H2AX) en respuesta a roturas de doble hebra modificando la estructura de la cromatina. γ H2AX es una proteína fundamental en la señalización precoz de este tipo de roturas y se puede observar a lo largo de regiones que ocupan megabases en torno a los focos de rotura. γ H2AX colocaliza con otras proteínas implicadas en la reparación del ADN

como MDC1, ATM, p53BP1, BRCA1 y el complejo MRN. La función de γ H2AX parece ser el fomentar la acumulación de estas proteínas, más que reclutarlas, en el foco de la rotura.

Si los eventos anteriores producen una reparación exitosa, la célula podrá mantener sus funciones normales y sobrevivir, en cambio, si el daño no puede ser reparado y ocurre de forma crónica, la célula puede entrar en senescencia o apoptosis, lo que puede tener implicaciones terapéuticas, por ejemplo, el uso de inhibidores de PARP1 en células deficientes en BRCA1 y BRCA2.³⁶²⁻³⁶⁴

Breast cancer 1, BRCA1, es una proteína implicada en el reconocimiento y reparación mediante recombinación homóloga de las roturas de doble hebra de DNA. La proteína BRCA1 tiene un importante papel en el mantenimiento de la estabilidad genómica, actuando de esa forma como un supresor tumoral. BRCA1 se combina con otras proteínas con función oncosupresora, sensores de daño al ADN y transductores de señales para formar un gran complejo protéico conocido como el *BRCA1-associated genome surveillance complex* (BASC).³⁶⁵ Otras asociaciones descritas son con MRE-11, RAD50 y p95, actuando también en la respuesta al daño al ADN.³⁶⁶

BRCA1 se asocia también con la ARN polimerasa II y con complejos de histona deactilasas. De esa forma, además de sus efectos en la reparación del daño al ADN y resolución de la recombinación genómica, tiene un papel en la transcripción.

Breast cancer 2, BRCA2, es una proteína del complejo de Anemia de Fanconi, FANCD1,³⁶⁷ que está implicada en la reparación del daño de doble hebra del ADN.

Daño al ADN en leucemias agudas mieloblásticas

Boherer et al demostraron en una serie de pacientes diagnosticados de LAM y SMDs que existía un grado de variabilidad interindividual al estudiar la activación de proteínas implicadas en el daño al ADN como pCKH1, pCHK2, pATM y γ H2AX.³⁶⁸ Aunque es cierto, que cuantitativamente era mayor en los grupos de pacientes con SMD de alto riesgo y LAM que en los SMD de bajo riesgo. Esto indica que, al igual que en los tumores sólidos, la vía ATM/CHK1/CKH2 está activada con la transformación neoplásica y posteriormente a esta.

Otra línea de evidencia del daño al ADN en las leucemias agudas mieloblásticas es la presencia de alteraciones en el número de copias usando arrays de hibridación genómica comparada (*CGH array*). En el trabajo de Suela et al, se encuentran alteraciones genómicas por CGH array en un 74% de los pacientes diagnosticados de LAM, afectando a todos los grupos citogenéticos clásicos, con una mediana de 2 alteraciones por caso (rango 0-35).³⁶⁹ Estas alteraciones son un reflejo de la inestabilidad genómica de las LAM.³⁶⁹

Mecanismos generales de resistencia a drogas

El objetivo de todo tratamiento contra el cáncer es la erradicación de las células tumorales mientras se preserva o se inflige el mínimo daño a los tejidos normales. Esto se consigue de varias formas, bien inhibiendo directa o indirectamente las señales necesarias para la proliferación y viabilidad de las células tumorales o bien estimulando una respuesta inmune. La resistencia a drogas continua siendo uno de los mayores problemas en el tratamiento de las neoplasias, ya que al final, la mayoría de los pacientes morirán por progresión de su enfermedad, al ser ésta refractaria a los tratamientos administrados.

Los mecanismos que pueden explicar la refractariedad de las enfermedades neoplásicas a los tratamientos son varios. En primer lugar, la célula tumoral puede ser intrínsecamente resistente debido a alguna de sus características genéticas. En segundo lugar, las células tumorales pueden adquirir mecanismos de resistencia tras la exposición a una droga. Los mecanismos de resistencia en las células tumorales irónicamente, en ocasiones derivan de los mecanismos presentes en las células normales para resistir el estrés citotóxico, Entre ellos nos encontramos mecanismos que alteran el transporte del fármaco a través de la membrana plasmática, reparación de ADN, alteraciones en moléculas diana, dificultad del fármaco para acceder a las células diana y factores de crecimiento.

Alteraciones en el transporte transmembrana

Son, probablemente, el conjunto más frecuente de mecanismos de resistencia observado en tumores. En 1976, se describió una glicoproteína (P-gp) que se asociaba con disminución de permeabilidad a fármacos en células de ovario de hamster chino.³⁷⁰ Posteriormente, se demostró que dicha proteína existía en células normales y que confería resistencia multidroga a células humanas.³⁷¹ Se demostró que la P-gp era una bomba de eflujo dependiente de energía.³⁷² La expresión de P-gp se ha asociado clásicamente a mal pronóstico en los pacientes con LAM.³⁷³ Estos descubrimientos hicieron suponer que P-gp sería el mayor causante de resistencia multidroga y que su inhibición llevaría a una nueva clase de tratamientos antineoplásicos eficaces. Actualmente sabemos que P-gp es uno de los 48 *ATP-Binding Cassette transporters (ABC transporters)*.³⁷⁴ Los *ABC transporters* facilitan el transporte de varios sustratos a través de membranas intra y extracelulares. Todos los *ABC transporters* son capaces de transportar fármacos citotóxicos de la misma manera que la P-gp. La relevancia clínica de este hecho se basa en dos hechos, el primero se trata de que los estudios in vitro prueban que las células que expresan estos transportadores efluyen los citotóxicos y les confiere resistencia a drogas en cultivos; el segundo hecho es que los pacientes que presentan expresión de *ABC transporters* en sus blastos tienen pronóstico desfavorable.

La P-gp (ABCB1, MDR1) confiere resistencia in vitro a fármacos usados en el tratamiento de las leucemias como antraciclinas, alcaloides de la vinca, mitoxantrone, metotrexate y otros.³⁷⁵ Múltiples estudios han confirmado que P-gp es un marcador de mal pronóstico en LAM del adulto,³⁷⁶⁻³⁸² sin embargo, este

hecho ha de ser matizado ya que el impacto de la expresión de P-gp es más acusado en individuos mayores de edad.^{377, 378, 383} Este mal pronóstico puede ser debido a que la expresión de P-gp es más alta en individuos mayores, o bien a la mayor intensidad de dosis de los protocolos de pacientes pediátricos.³⁸⁴

La Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2) fue descubierta en una línea de cancer de mama.³⁸⁵ Sus niveles altos *in vivo* y su función se correlacionan refractariedad al tratamiento de inducción y menor supervivencia global.^{380, 386-388}

ABCC1, MRP1 o *Multidrug resistance associated protein* tiene un papel controvertido en el pronóstico en LAM, ya que no existen resultados concluyentes en la literatura, si bien los trabajos son metodologicamente cuestionables,³⁸⁹⁻³⁹³ sin embargo, sí parece claro su factor pronóstico adverso en los pacientes tratados con Gentuzumab ozogamicin.^{394, 395}

Lesiones genéticas

Los defectos en la maquinaria apoptótica pueden constituir un modelo alternativo de resistencia a drogas como se ha explicado anteriormente, además de ello, otras vías de transducción de señales como Raf/MEK/Erk,^{149, 153, 160} PI3K/PTEN/Akt,^{149, 160} o JAK/STAT,¹⁴⁹ pueden provocar resistencia a drogas.

Reparación de ADN

Otra de las formas en las que las células se pueden volver resistentes es mediante la acción de proteínas de reparación de ADN, si bien este campo no está explorado en las LAM.³⁹⁶

Metabolismo de los fármacos

No ahondaremos en este tema, aunque existen evidencias de que los polimorfismos en enzimas implicados en la metabolización de tóxicos pueden provocar cambios en la respuesta al tratamiento de las LAM, o incluso en su desarrollo.^{397,398}

Tratamiento de las leucemias agudas mieloblásticas

La combinación de citarabina en infusión continua durante 7 días y una antraciclina (Daunorrubicina o Idarrubicina) durante 3 días (Régimen 3+7) permanece como el patrón estándar de tratamiento de la LAM desde hace más de 30 años. Desafortunadamente, en todo este tiempo, y a pesar de modestos incrementos en la supervivencia, gracias a una mejoría del tratamiento de soporte, no ha habido aportaciones sustanciales en sentido de descubrimiento de nuevos fármacos activos en las LAM.^{1,7,9}

El tratamiento de las LAM consta de dos fases. La primera o inducción a la remisión intenta conseguir una remisión completa, con menos de un 5% de células inmaduras en médula ósea, sin evidencia clínica ni morfológica de la enfermedad y con recuperación hematopoyética, definida como recuento de neutrófilos mayor de 1000/uL y recuento de plaquetas mayor de 100000/uL.⁶ La obtención de una remisión completa es condición sine qua non para la curación de la enfermedad.⁵

La segunda fase, o de consolidación intenta aumentar la duración de la remisión completa. La capacidad de mantener ésta aumenta con el tiempo.³⁹⁹

Tratamiento en pacientes jóvenes

La combinación de las antraciclinas daunorubicina (45mg/m² o 60mg/m²) o idarubicina (12mg/m²) en bolo durante tres días con citarabina a dosis estándar (100-200mg/m²) durante 7 días en infusión continua, permite una tasa de remisión completa entre de 65-75% en pacientes entre 18 y 60 años de edad.^{1,7,9}

El mecanismo de acción de las antraciclinas es la inhibición de la topoisomerasa y la inducción de apoptosis por daño al ADN y a p53,^{400, 401} La citarabina, tras ser fosforilada por la deoxicitidina kinasa actúa como un antimetabolito que mata de forma ciclo específica impidiendo la progresión en la fase S, fundamentalmente por la inhibición de la ADN polimerasa, pero también se incorpora en el ADN y ARN pudiendo desencadenar señales de daño al ADN, además de activar caspasas, degradar BCL-2, liberar radicales libres de oxígeno y desfosforilar la unidad p65 de NF-kappaB.^{402,403}

Los intentos por aumentar la tasa de remisiones completas mediante el uso de mitoxantrone,⁴⁰⁴ altas dosis de citarabina,^{18, 405} moduladores de MDR-1,⁴⁰⁶⁻⁴⁰⁸ un tercer agente citotóxico,⁴⁰⁹⁻⁴¹¹ o factores de crecimiento, han fracasado, aunque podrían mejorar la tasa de remisiones en ciertos subgrupos de pacientes.

El mayor problema del aumento de dosis es el incremento de toxicidad y mortalidad relacionada con el tratamiento, particularmente en los subgrupos de buen pronóstico como t(8;21), inv(16), LAM-CN con NPM1mut y FLT3-WT) o con mutaciones de CEBPA.¹ Otro problema es qué hacer con los pacientes con cariotipos de mal pronóstico, donde la tasa de remisión completa no suele superar el 50%,^{24, 53, 73, 412} siendo por lo tanto, candidatos a nuevas terapias dentro del marco de ensayos clínicos bien diseñados dado su mal pronóstico.

Tras la obtención de una remisión completa, los pacientes toleran mejor el tratamiento, por lo que pueden recibir dosis de quimioterapia más altas. La citarabina a dosis altas es la base del tratamiento postremisión en leucemias con alteraciones del CBF, con supervivencias globales en torno al 60-75%.^{75,413}. En los pacientes de riesgo intermedio, el trasplante alogénico o autólogo parece ofrecer una supervivencia similar a los tratamientos de consolidación,^{19,20,25,414} si bien hay un trabajo que muestra ventaja en supervivencia en el grupo de trasplante alogénico.⁴¹⁵ En cambio, en los pacientes de alto riesgo, los resultados de la consolidación con quimioterapia o trasplante autólogo son muy malos, con menos de 10% de largos supervivientes.^{75,414} Estos malos resultados en pacientes de alto riesgo han inclinado la balanza a favor del alotrasplante en primera remisión completa.^{414, 416-418} Sin embargo, se requiere más ensayos prospectivos para definir el papel definitivo de los tratamientos de consolidación en LAM.

Tratamiento en pacientes mayores

Los pacientes mayores presentan unas características especiales dentro de las Leucemias Agudas Mieloblásticas, tanto por parte de la enfermedad en sí, (hemopatía previa, aumento de resistencia a drogas,...) como por las características del paciente, lo que limita los tratamientos disponibles.^{3,419,420} Esto hace que los tratamientos de inducción en pacientes mayores tengan peores resultados y más toxicidad que en los pacientes más jóvenes.⁴²¹ Las opciones terapéuticas que se pueden contemplar en los pacientes mayores son: quimioterapia convencional, quimioterapia a dosis bajas, agentes no mielosupresivos, tratamiento de soporte o fármacos experimentales.³

Características de las LAM del anciano
Mayor incidencia de LAM secundaria
Peor estado general
Citopenias más frecuentes al diagnóstico
Menor porcentaje de blastosis medular
Mayor expresión de proteínas MDR
Mayor frecuencia de cariotipos de pronóstico adverso
Mayor morbimortalidad asociada con el tratamiento

Tabla 3: Características de las Leucemias agudas del anciano. Adaptado de Craig *et al.*³

Nuevos fármacos en LAM

Si bien el tratamiento estandar de los pacientes jóvenes de riesgo bajo o intermedio está bien establecido; el tratamiento de los pacientes jóvenes con cariotipos de mal pronóstico y de la mayoría de pacientes mayores no debería limitarse necesariamente al el 3+7 si no que otras aproximaciones deberían de ser consideradas. Entre los nuevos fármacos con potencial terapéutico en la LAM nos encontramos:

Anticuerpos monoclonales

Gentuzumab ozogamicin: Se trata de un anticuerpo monoclonal murino anti-CD33 humanizado unido a calicheamicina, con indicaciones aprobadas en LAM refractaria en pacientes mayores de 60 años, donde tiene una tasa de respuesta del 30% en monoterapia.⁴²² Presenta efecto sinérgico con agentes

quimioterápicos como antraciclinas y citarabina,⁴²³ lo que mejora potencialmente sus resultados, aunque no existe todavía ningún ensayo randomizado que haya confirmado esta hipótesis.⁴²⁴ Los pacientes tratados con Gentuzumab ozogamicin (GO) presentan mayor riesgo de síndrome de obstrucción sinusoidal, principalmente a dosis altas de GO.⁴²³

Su valor en primera línea o en el tratamiento de acondicionamiento en pacientes refractarios está siendo probado en varios ensayos clínicos prospectivos, aunque ya existen ensayos fases I/II que muestran un perfil de seguridad aceptable con bajas o nulas tasas de síndrome de obstrucción sinusoidal y una alta tasa de remisiones completas.⁴²⁵⁻⁴²⁷

Análogos de purinas

Los análogos de purinas son antimetabolitos que simulan la estructura de purinas inhibiendo la síntesis de ADN. Los dos más usados en LAM son la Fludarabina y la Clofarabina. Fludarabina ha sido usada en regimenes de rescate (FLAG y variantes principalmente)⁴²⁸⁻⁴³⁰. Fludarabina presenta sinergia con Ara-C y G-CSF.⁴³¹

La clofarabina, es un análogo de purinas con unas características especiales, entre ellas, la presencia de un grupo alquilante, por lo que, además de la inhibición de síntesis, produce daño directo al ADN.⁴³² Además, produce acumulación de Ara-CTP, metabolito activo de citarabina.⁴³³ La actividad de clofarabina ha sido estudiada tanto sola como en combinación, principalmente en pacientes mayores, con tasas de remisión completa en torno al 60% en tratamiento de primera línea y con resultados esperanzadores en pacientes refractarios.⁴³⁴⁻⁴³⁶

Inhibidores de Kinasas

Como hemos visto anteriormente, entre un 15 y un 35% de los pacientes con LAM serán portadores de una FLT3-LM, con mayor frecuencia en pacientes mayores.⁴³⁷ Los inhibidores de tirosin kinasas compiten con el ATP, por lo que, aunque la proteína está presente, no será capaz de fosforilar sustratos.⁴³⁷ Los inhibidores de FLT3 han mostrado eficacia en monoterapia, pero la pérdida de respuesta (resistencia secundaria) o la no respuesta (resistencia primaria) de muchos pacientes con FLT3-LM, puede comprometer su uso.^{7, 438} Esa pérdida de respuesta es atribuida en principio a sobreexpresión de FLT3 y compensación de su pérdida de función por otras vías, aunque también puede ser producida por otras mutaciones adicionales a FLT3-LM o distintas mutaciones del dominio tirosin kinasa.⁴³⁹⁻⁴⁴³ Al igual que con GO, los inhibidores de kinasas no parecen fármacos idóneos para la monoterapia y probablemente serán más efectivos cuando se combinen con quimioterápicos clásicos o con inhibidores de vías de señalización intracelular.^{444,445}

Los inhibidores de FLT3 en fases más avanzadas de desarrollo clínico son:

Lestaurtinib (CEP701): Produce inhibición de la fosforilación de FLT3 de forma dosis dependiente. No presenta inhibición significativa de PDGFR, FMS o KIT.⁴⁴⁶

Midostaurina (PKC412) Presenta efecto sinérgico con fármacos clásicos en líneas celulares con FLT3-LM, pero es antagónico con los mismos fármacos en líneas FLT3-WT, probablemente debido a sus efectos diferenciales sobre ciclo celular: provoca parada en G0-G1 en las primeras y en G2-M en las segundas.⁴⁴⁷

Sorafenib: Es un inhibidor multikinasa, Raf, VEGFR, PDGFR, KIT y FLT3.^{448,449} Actualmente aprobado para el tratamiento de Hepatocarcinoma y carcinoma renal de células claras, pero tiene un potente efecto antileucémico.⁴⁵⁰

Sunitinib: Es un inhibidor multikinasa que afecta a VEGFR, PDGFR, GSF-1, KIT y FLT3.⁴⁵¹ Se ha demostrado que presenta sinergia in vitro con inhibidores de mTOR.⁴⁴⁴

Tandutinib: Inhibe receptores tirosin kinasa de clase III⁴⁵², y presenta un perfil farmacocinético que facilita su administración oral.⁴⁵³

AC220: Es un nuevo inhibidor de tirosina kinasa que presenta actividad en el rango nanomolar bajo, con una vida media larga en suero y con actividad en modelos animales y con una actividad prometedora en ensayos clínicos precoces.

Fármaco	IC ₅₀ FLT3 WT (nM)	IC ₅₀ FLT3-ITD (nM)	t _{1/2} , suero (h)
Lestaurtinib	10	2	8
Midostaurina	30	3	>24
Sorafenib	28	3	>24
Sunitinib	2	1	>24
AC220	5	1	>24
Tandutinib	220	10-30	<24

Tabla 4: Características de los distintos inhibidores multikinasa en desarrollo para Leucemias Agudas Mieloblásticas. Adaptado de Pratz *et al.*⁴³⁹

Otros inhibidores de quinasas como dasatinib e imatinib han sido poco estudiados en LAM salvo en crisis blásticas de Leucemias Mieloides Crónicas.

Modulación epigenética

Los agentes hipometilantes azacitidina o decitabina pueden modificar la historia natural de los síndromes mielodisplásicos.⁴⁵⁴ Dado el solapamiento entre los SMD y las LAM, esto podría ser cierto también en éstas, y esa confirmación llegó indirectamente, al analizar los resultados de los ensayos 8421, 8921, y 9221 del *Cancer and Leukemia Group B*, y observar que los pacientes reclasificados como LAM tenían un aumento de supervivencia con Azacitidina frente a abstención.⁴⁵⁵

El mecanismo de acción se basa en la inhibición de la ADN metiltransferasa. La decitabina solamente se incorpora al ADN, con mayor actividad *in vitro*, aunque no se ha realizado comparación *in vivo*.⁴⁴⁵

Los inhibidores de histona deacetilasas pueden evitar la condensación cromatínica y permitir una expresión génica normal.⁴⁵⁶⁻⁴⁵⁸ Los agentes usados en los primeros trabajos son fenilbutirato, ácido valproico y vorinostat. Los resultados con estos agentes no han sido los esperados,^{456, 459} por lo que rápidamente se ha pasado a ensayos de combinación de un agente hipometilante y un inhibidor de histona deacetilasa,¹⁹⁹ o con antraciclinas.^{460, 461} Además nuevos inhibidores de histona deacetilasa están en desarrollo, tanto *in vitro* como *in vivo*.^{462,463}

Inhibidores de moléculas de adhesión

El *chemokine stromal cell-derived factor-1* (SDF-1) y su receptor, CXCR4 son parte de los mecanismos por los que el blastos se mantienen en el micromedioambiente medular y son importantes en su liberación a sangre periférica, por lo que los inhibidores de CXCR4 podrían movilizar los blastos del

nicho medular y favorecer el efecto de los fármacos tanto quimioterápicos clásicos como nuevas terapias.⁴⁶⁴⁻⁴⁶⁸

iMIDs

La eficacia de talidomida en pacientes con LAM ha sido modesta.⁴⁶⁹⁻⁴⁷¹ La Lenalidomida ha demostrado eficacia en pacientes con LAM,^{472, 473} aunque de momento se trata de casos aislados, sin ningún ensayo clínico que sostenga su uso.

Inhibidores de apoptosis

Oblimersen es un oligonucleótido antisentido diseñado para unirse a los seis primeros codones del BCL2 human,²⁷³ Los ensayos clínicos fase I/II indican actividad en combinación con quimioterapia clásica o con GO.⁴⁷⁴⁻⁴⁷⁶, encontrándonos en este momento en espera de resultados de ensayos fase III.

Los inhibidores de XIAP se encuentran en fases tempranas del desarrollo, existen dos grupos principales, los oligonucleótidos antisentido y las pequeñas moléculas.^{301,477}

La inhibición de TRAIL por anticuerpos monoclonales no afecta a la hematopoyesis normal, aunque puede suprimir el crecimiento de las células iniciadoras de leucemia en un modelo de trasplante,⁴⁷⁸ y no parece verse afectado por altos niveles de proteínas antiapoptóticas.⁴⁷⁹

Hipótesis y Objetivos

A pesar de los avances en el conocimiento de la patogenia de las leucemias agudas mieloblásticas, su tratamiento específico no ha sido modificado substancialmente en las últimas décadas y una parte importante de los enfermos presentan resistencia terapéutica primario o falleciendo de su enfermedad. Para estos pacientes, la búsqueda de nuevos fármacos, con mecanismos de acción diferentes de los agentes convencionalmente usados en las leucemias agudas mieloblásticas, es una necesidad imperiosa. En esta situación, nuestra hipótesis es que disponer de modelos preclínicos, utilizando líneas celulares de leucemias agudas mieloblásticas y muestras *ex vivo* de pacientes, podría contribuir a la investigación sobre la eficacia y mecanismo de acción de nuevos fármacos. Más aún, pensamos que un apartado de particular importancia sería el estudio de posibles sinérgicos farmacológicos que pudieran contribuir a descubrir combinaciones de alto potencial antileucémico y que eventualmente se trajeran en la translación a los pacientes a través de los oportunos ensayos clínicos.

Basándonos en esta hipótesis, nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Establecer la eficacia antileucémica de fármacos clásicos como Arac-C, Fludarabina y Doxorubicina, con el fin de disponer de un patrón de referencia para la ulterior comparación con nuevos fármacos en fase preclínica/experimental. La eficacia se definirá en líneas celulares y células de pacientes.
2. Investigar la eficacia y mecanismo de acción de tres fármacos en fase preclínica:
 - 2a. El inhibidor del proteasoma Bortezomib (PS-341)
 - 2b. El inhibidor Pan-acetilasa: Panobinostat (LBH589)

2c. Zalypsis, un nuevo fármaco de origen marino.

Para realizar el Segundo objetivo, en cada fármaco se estudiará

1a. El efecto antitumoral y el perfil de toxicidad.

1b. El posible sinergismo de las combinaciones de estos agentes con agentes clásicos.

1c. El efecto sobre el ciclo celular y apoptosis.

1d. Los cambios que inducen en el perfil de expresión génica.

Material y Métodos

1- Líneas celulares

Se utilizaron las siguientes líneas celulares de LAM: HEL, KG-1, HL-60 y MV4-11 (Dr. H.G. Dexler, DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH). Todas ellas fueron cultivadas en atmósfera húmeda en presencia de 5% de CO₂ y 95% de aire a 37°C, en medio RPMI-1640 con 2 mM de L-glutamina, suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) y antibióticos (penicilina a 100 U/ml y estreptomina 100 µg/ml) (Invitrogen Corporation (Gaithersburg, Md.), en placas de 9 cm de diámetro. Las características de cada línea celular se resumen en la Tabla 5.

Línea celular	Origen	Inmunofenotipo	Citogenética	Biología Molecular
HL-60	LAM-M2	CD3-, CD13+, CD14-, CD15+, CD19-, CD33+, CD34-, HLA-DR-	Tetraploide, con subpoblación casi tetraploide.	Amplificación de c-myc
HEL	LAM-M6	CD3 -, CD13 +, CD14 -, CD15 +, CD19 -, CD33+, CD34+, CD41 +, CD235a +	Hipotriploide. del(5q) y del(20)	Mutación de JAK2
MV4-11	LAM-M5	CD3 -, CD4 +, CD5 -, CD8 -, CD10 -, CD13 +, CD14 -, CD15 +, CD19 -, CD21 -, CD25 -, CD33 +, CD34 -	48 (46-48) <2n>XY, +8, +18, +19, -21, t(4;11)(q21;q23)	FLT3-ITD
KG-1	LAM-M6	CD3 -, CD4-, CD13 +, CD14 -, CD15 +, CD19 -, CD33 +, CD34 +, HLA-DR +	Hipodiploide con una población marginal hiperdiploide	Reordenamiento que afecta a FGFR1

Tabla 5: Características de las líneas celulares de Leucemia Aguda Mieloide usadas en este trabajo

2- Células procedentes de pacientes

Se aisló la fracción mononucleada procedente de aspirados de médula ósea (MO) de 40 pacientes diagnosticados de LAM al diagnóstico o en recaída. Las células se cultivaron en frascos de 75 cm² en las mismas condiciones que las líneas celulares, excepto en la cantidad de FBS, que fue del 20%. Las características de los pacientes de los que se obtuvieron muestras de médula ósea para los estudios de toxicidad *ex vivo* se especifican en los capítulos correspondientes.

3- Medida de la viabilidad y proliferación celular

3.1. MTT

El ensayo de MTT (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheniltetrazolium bromide*) es un método colorimétrico que mide cuantitativamente la actividad metabólica de las células viables.⁴⁸⁰ Las células metabólicamente activas reducen en la mitocondria la sal de tetrazolium (MTT), de color amarillo e hidrofílica, a un compuesto hidrofóbico (formazán), de color azul oscuro. Tras la captación del MTT, las células se rompen y se solubiliza el formazán con Isopropanol:HCl. La absorbancia de cada muestra es directamente proporcional al número de células viables, por lo que se puede calcular la inhibición de crecimiento provocada por los fármacos. Concentración inhibitoria mínima 50 (IC₅₀) es aquella concentración

de fármaco que provoca una disminución del 50% de reducción del MTT con respecto al control.

Reactivos

- MTT; Sigma, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheniltetrazolium bromide, 5mg/ml disuelto en PBS.
- Isopropanol-Ácido clorhídrico (Isopropanol:HCl), 480 mL Isopropanol + 20mL HCl 1N.

Procedimiento

1. Sembrar 30.000 células (100 μ l/pocillo) en placas de 96 pocillos.
2. Después del tratamiento con cada fármaco a diferentes concentraciones y tiempos, añadir 10 μ l de MTT a cada pocillo e incubar durante 2 horas a 37°C.
3. Añadir 100 μ l de Isopropanol:HCl, mezclando hasta resuspender el botón celular.

La absorbancia se midió en un lector de placas (TECAN Infinite F500), a una longitud de onda: $\lambda=570$ nm, utilizando una λ de referencia de 630 nm. Se analizaron 3 experimentos independientes realizados por cuadruplicado, los datos se presentan como la media \pm desviación estándar de cuadruplicados. La IC_{50} se calculó con el programa Microsoft Office Excel.

4- Estudio de apoptosis por Citometría de Flujo Multiparamétrica

4.1. Anexina V-Ioduro de Propidio. Estudio en líneas celulares.

Durante la apoptosis ocurren cambios tempranos en la superficie celular, que llevan al reconocimiento y fagocitosis de las células apoptóticas. Los cambios en la superficie celular como la pérdida de residuos de ácido siálico y la pérdida de la asimetría en los fosfolípidos de la membrana, principalmente, la externalización de la fosfatidilserina (PS), que altera la carga e hidrofobia de la misma. En una célula normal, estos residuos están en la cara interna de la membrana y son inaccesibles para la anexina V. En la fase inicial de la apoptosis los residuos de PS quedan expuestos en la cara externa de la membrana, con acciones procoagulantes y proinflamatorias, manteniéndose la integridad de la membrana celular.²⁶⁶ La anexina V es una proteína de unión a fosfolípidos cargados negativamente, dependiente de Ca^{++} , que se une con gran afinidad a los residuos de fosfatidilserina de la membrana celular,³³² por lo que permite medir la pérdida de polaridad de la membrana celular, y, por tanto, ser usada como marcador de apoptosis incluso antes de que la integridad de la membrana celular se haya perdido e incluso antes de la aparición de cambios morfológicos asociados con la apoptosis.^{267,268,481}

Cuando la célula se encuentra en una fase más avanzada de apoptosis, la membrana celular se permeabiliza, y el IP es capaz de marcar el ADN del núcleo.

Este marcaje adicional nos permite diferenciar las células en apoptosis tardía y las células necróticas (Figura 12).⁴⁸²

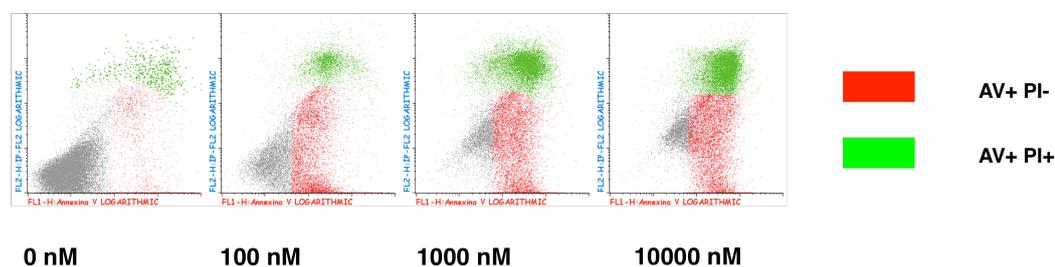


Figura 12: Las células HL60 fueron tratadas con Citarabina a las dosis indicadas durante 24 horas y posteriormente se realizó marcaje con anexina V (AV) y yoduro de propicio (PI).

Reactivos:

Para el marcaje utilizamos el siguiente “kit”: human Annexin V-FITC (Bender MedSystems™), que contiene Anexina, IP (20 µg/ml) y tampón de unión (Hepes/NaOH, 10 mM, pH 7,4, NaCl, 140 mM, CaCl₂ 2,5 mM).

Procedimiento:

Para la detección de apoptosis se marcaron 1 x 10⁶ células, control y tratadas con cada fármaco a diferentes tiempos y dosis.

1. Recoger y centrifugar a 300 g durante 3 minutos.
2. Lavar con D-PBS que contiene: CaCl₂, MgCl₂ (Gibco) y diluir en 200 µl de tampón de unión.
3. Añadir 10 µl de Anexina y 10 µl de IP e incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad

Se adquirieron un total de 50.000 células en un citómetro de flujo FACSCalibur utilizando el programa CellQuest™ (BD Biosciences). Para el análisis fenotípico se utilizó el programa Paint A Gate-PRO™ (BD Biosciences) y el

programa Infinicyt™ (Cytognos, Salamanca, España). Las células blásticas se identificaron basándonos en las características típicas de dispersión de luz-tamaño celular (FSC, “forward scatter”) y complejidad interna (SSC, “side scatter”) al tratarse de una población pura.

4. 2. Estudios *ex vivo*.

4. 2. 1. Separación de capa mononuclear con Ficoll-Hypaque

La separación por Ficoll-Hypaque se basa en una centrifugación con gradiente de densidad para separar las distintas células de la médula ósea o sangre periférica.

Reactivos:

- Ficoll-Paque™ Plus. (Ameresham Biosciences)
- RPMI-1640.
- RPMI-1640 con L-glutamina 2 mM, 20% de suero bovino fetal y 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. (Invitrogen Corporation (Gaithersburg, Md.).

Procedimiento:

1. Colocar cuidadosamente 4mL de sangre periférica (o 2mL de médula ósea) sobre 8mL de Ficoll-Paque™ Plus (dilución 1:2 o 1:4 respectivamente)
2. Centrifugar 35minutos a 1800 r.p.m.
3. El sobrenadante tras la centrifugación, contendrá plasma y plaquetas, mientras que el pellet contendrá los granulocitos y hematíes que han pasado la capa de Ficoll. Conservar la capa de células que se ha depositado sobre el reactivo de separación, evitando su contacto con el Ficoll.

4. 2. 2. Lisis de Hematíes con Cloruro Amónico

Reactivos:

- Tampón de lisis que contiene: EDTA, KHCO₃ y NH₄Cl.
- RPMI-1640.
- RPMI-1640 con L-glutamina 2 mM, 20% de suero bovino fetal y 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. (Invitrogen Corporation (Gaithersburg, Md.).

Procedimiento:

1. Mezclar 2 ml de la muestra de MO con 7 ml de tampón de lisis y mantener a 4°C durante 15 minutos.
2. Centrifugar a 300 g, durante 10 minutos a 4°C.
3. Lavar dos veces con RPMI-1640.
4. Cultivar en RPMI-1640 al 20% de SBF.
5. Plaquear 1.000.000 células en dos ml de medio en placas de 6 pocillos.
6. Añadir cada fármaco e incubar durante 18-48 horas, dependiendo del fármaco a estudio.
7. Recoger las células y lavar con 1 ml de PBS.

4. 2. 3. Identificación de las poblaciones de interés

Para diferenciar las células blásticas de otros tipos celulares, realizamos un marcaje multiparamétrico basado en la combinación de Anexina V-FITC y

anticuerpos monoclonales (CD33, CD34 y CD45). El uso de los tres primeros permite la identificación de los blastos mieloides, incluso diferenciando las poblaciones más maduras (CD33-/+; CD34-; CD45dim) de las más inmaduras (CD34+, CD45dim); CD45, junto con las características de FSC/SSC, contribuye a la identificación de otras poblaciones hematopoyéticas, en la misma muestra incluyendo linfocitos (CD45++, SSClow) y monocitos (CD45+, CD33++).

Esta técnica permite, mediante paneles adecuados, (ver apartado “paneles”), la identificación de cada población celular presente en la muestra y el estudio independiente de apoptosis sobre cada una de ellas, incluyendo a las células precursoras CD34+ de muestras de enfermos con Leucemias Mieloblásticas o en donantes sanos, incluso definiendo subpoblaciones dentro de las células inmaduras (no comprometidas a línea, comprometidas a línea mieloide y a línea linfoide).^{320,483-487}

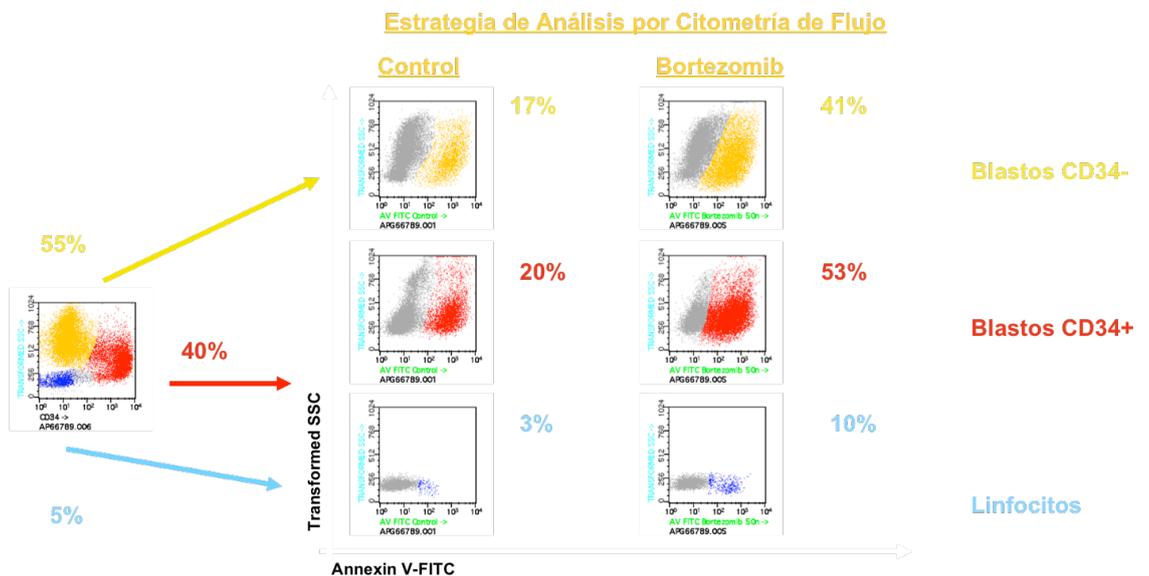


Figura 13: Medida de la apoptosis en células de pacientes.

Reactivos:

Anexina V-FITC (Bender MedSystems).

Anti-HLA-DR-PE (BD Biosciences).

Anti-CD64-PE (Dako).

Anti-CD45-PerCP/Cy5 (BD Biosciences).

Anti-CD19-PerCP/Cy5 (BD Biosciences).

Anti-CD34-APC (BD Biosciences).

Anti-CD45-AmCyan (BD Biosciences).

Anti-CD38-AlexaFluor 700 (BD Biosciences).

Paneles:

AnexinaV-FITC/CD33-PE/CD45-PerCP-Cy5/CD34-APC;

AnexinaV-FITC /HLA-DR-PE/CD45-PerCP-Cy5/CD34-APC;

AnexinaV-FITC/CD64-PE/CD19-PerCP-Cy5/CD34-APC/CD45-AmCyan/CD38-

Allexa Fluor 700;

Procedimiento:

1. Recoger las células de las placas
2. Lavar con PBS Ca^{2+} Mg^{2+} .
3. Preparar Binding buffer.
4. Añadir 10 μl de anticuerpo conjugado con PE, 8 μl de anticuerpo conjugado con PerCP/Cy5, 5 μl de anticuerpo conjugado con APC, AmCyan o Allexa Fluor700, y 5 μl de Anexina V-FITC.
5. Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.

6. Lavar con PBS Ca^{2+} Mg^{2+} .
7. Adquirir en citómetro.

5- Potencial de membrana mitocondrial

La disfunción mitocondrial dentro del proceso apoptótico está frecuentemente asociada con la pérdida de potencial de la membrana mitocondrial (PMM), que ocurre durante las primeras fases de la apoptosis.^{488, 489} Una técnica para medir alteraciones en la membrana es el marcaje con 3,3' dihexyloxacarboyanine iodide (DiOC6), que es un flourocromo catiónico que se acumula en la mitocondria.⁴⁹⁰ La disminución del PMM se asocia con la disminución de la captación de DiOC6.⁴⁹¹⁻⁴⁹³

Reactivos:

- DiOC6 (3) (Molecular Probes).

Procedimiento:

1. Recoger y centrifugar 500.000 células a 300 g durante 3 minutos.
2. Lavar con PBS y resuspender en 200 μl .
3. Incubar con DiOC₆ 20 nM, durante 20 min, a 37°C, en oscuridad.
4. Lavar con PBS.
5. Añadir 10 μl de IP (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

A continuación se procedió a la medida del potencial mitocondrial utilizando un citómetro de flujo FACSCalibur y el programa CellQuest (BD Biosciences). Para el análisis de los datos se utilizó el programa Paint A Gate-PRO (BD Biosciences) y el programa Infinicyt™ (Cytognos, Salamanca, España). (Figura 14).

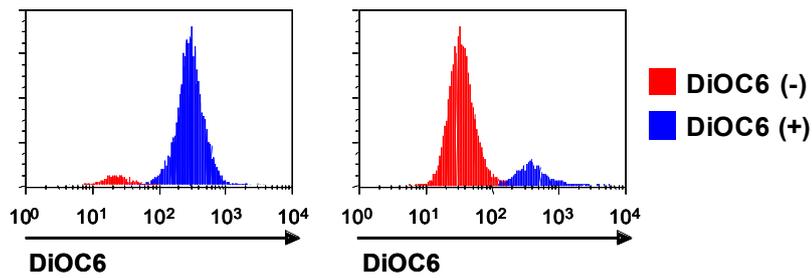


Figura 14: Análisis del potencial mitocondrial por citometría de flujo antes y después del tratamiento con bortezomib en la línea celular HEL.

6- Fragmentación de ADN en geles de agarosa.

La apoptosis se caracteriza bioquímicamente por la rotura del ADN genómico en pequeños fragmentos de unos 180pb. Se trata de un proceso bastante temprano (anterior a la desintegración de la membrana), irreversible y generalizado, que conduce a la muerte celular. El estudio cualitativo de este fenómeno se realiza al extraer el ADN de las células y observar el característico patrón del ADN fragmentado, tras hacer una electroforesis en gel de agarosa.

Reactivos:

Tampón de lisis (5 mM Tris-HCl pH 7,4, 20 mM EDTA, 0,5% Tritón X-100).

TE (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA, pH 8,0).

TBE (45 mM Tris, 45 mM ácido bórico, 1 mM EDTA pH 8,0).

Bromuro de etidio (BrEt, 10 mg/ml).

Procedimiento:

1. Recoger y lavar con PBS 2×10^6 células para cada tratamiento.

2. Añadir tampón de lisis, y dejar a 4°C durante 20 minutos. Centrifugar durante 15 minutos a 13.000 *g* y a 4°C. En el sobrenadante queda el ADN.
3. Extracción del ADN con fenol-cloroformo-isoamilalcohol (25:24:1).
4. Precipitación del ADN con 0.1 Volúmenes de acetato sódico 3 M, pH=7, y 2 Volúmenes de etanol, durante 30 minutos. Centrifugar a 13.000 *g*, 10 minutos y a 4°C.
5. Lavar con etanol al 70%, centrifugar la muestra 10 minutos a 13.000 *g* y dejar secar.
6. Diluir el ADN en 40 µl de TE.
7. Incubar con ARNsa A (20 µg/ml) durante 30 minutos a 37°C antes de analizar en un gel al 1.2 % agarosa-TBE.

Como control positivo en estos ensayos utilizamos Bortezomib, un inhibidor del proteasoma, que induce fragmentación de ADN.¹⁸

7- Estudio del ciclo celular

La cuantificación del contenido ADN permite determinar la distribución de una población celular a lo largo de las distintas fases del ciclo celular. La distribución celular de una población se analiza por citometría de flujo utilizando colorantes de ADN que se unen a los ácidos nucleicos de forma estequiométrica incrementando su fluorescencia. La cantidad de colorante unido será proporcional a la cantidad de ADN, y por tanto la cantidad de fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de ADN de cada célula.

7.1. Ioduro de Propidio

El fluorocromo más utilizado para este tipo de estudios es el ioduro de propidio. Sus ventajas principales son la facilidad de uso, estabilidad y espectro de absorción/emisión, que le hace válido para la mayoría de citómetros de flujo. Se excita con luz entorno a los 480 nm (para lo cual resulta válido un láser de Argón-ión) y emite fluorescencia roja (620 nm). Las moléculas de ioduro de propidio se intercalan entre los pares de bases de los ácidos nucleicos, tanto del ADN como del ARN, por lo cual es necesario eliminar éste último por procesos enzimáticos (RNAsa) si se quiere una determinación lo más exacta posible de la cantidad de ADN.⁴⁹⁴

Se sembraron 2×10^6 células (1×10^6 células/ml) para cada tratamiento en placas de 6 pocillos.

Reactivos y procedimiento:

1. Recoger y centrifugar las células en tubos limpios a 300 g durante 3 minutos.
2. Lavar con PBS, y resuspender en 700 μ l etanol frío al 70%, incubar durante toda la noche a 4°C.
3. Lavar las células tres veces y resuspender en 1 ml de PBS.
4. Añadir 15 μ g de ioduro de propidio (IP) y 0,5 mg de RNAsa A. Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente, en agitación y oscuridad.

A continuación se procedió a la medida del ciclo celular utilizando un citómetro de flujo FACSCalibur y el programa CellQuest (BD Biosciences). Para el análisis de los datos se utilizó el programa Paint A Gate-PRO™ (BD Biosciences) y el programa Infinicyt™ (Cytognos, Salamanca, España) (Figura 15).

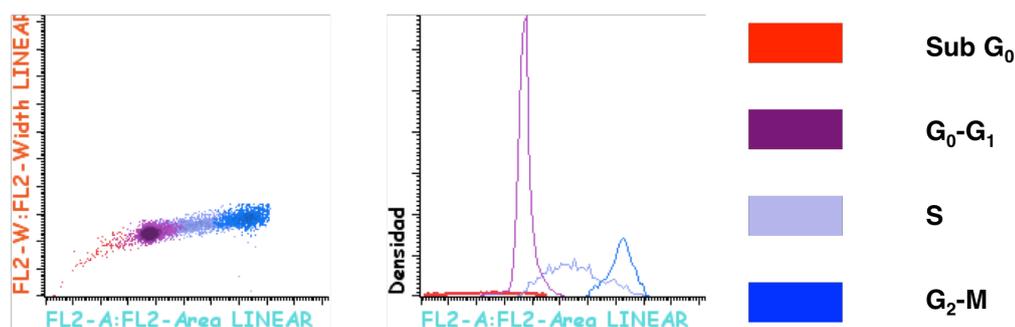


Figura 15: Ejemplo de estudio de ciclo celular con ioduro de propidio. Se utilizaron células HEL en tercer pase.

7.1. DRAQ5™

DRAQ5™ es una sonda de reciente introducción derivada de antraquinonas que emite en el rojo lejano que presenta la particularidad de unirse al ADN de células viables sin necesidad de permeabilización celular, por lo que no daña antígenos de superficie, sin unirse al RNA.⁴⁹⁵⁻⁴⁹⁷

Se sembraron 1×10^6 células ($0,5 \times 10^6$ células/ml) para cada tratamiento en placas de 6 pocillos.

Reactivos y procedimiento:

1. Recoger y centrifugar las células en tubos limpios a 300 g durante 3 minutos.
2. Lavar con PBS y resuspender, obteniendo una concentración celular menor de $\leq 4 \times 10^5$ /mL.
3. Añadir 5 μ L DRAQ5™ directamente al volumen final.
4. Incubar de 5-30 minutos en oscuridad.

A continuación se procedió a la medida del ciclo celular utilizando un citómetro de flujo FACSCanto II y el programa FACSDiva (BD Biosciences). Para el análisis de los datos se utilizó el programa Infinicyt™ (Cytognos, Salamanca, España) (Figura 15).

8- Microarrays de RNA

Se analizaron los cambios inducidos por los diferentes fármacos en los perfiles de expresión génica de las células blásticas al inicio de la muerte celular, y por tanto, cuando las células todavía son viables y mantienen un ARN de buena calidad. Para ello se realizaron estudios de tiempo-respuesta con Anexina /IP con el fin de determinar las condiciones que inducían un mínimo de apoptosis (15 % de la fracción viable de la muestra) con cada fármaco.

8.1. Extracción del ARN total.

Se congelaron 10^7 células en 1 ml de Trizol® (Invitrogen Life Technologies, Gaithersburg, MD) a -80°C . Posteriormente se procedió a la extracción del ARN.

Reactivos y procedimiento:

1. Descongelar la muestra en un baño a 37°C y homogeneizarla con una jeringa con aguja de 0,5 mm.
2. Añadir 500 μl de isopropanol e incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
3. Centrifugar a 13.000 g , durante 10 minutos a 4°C , lavar el sedimento con 1 ml de etanol al 75% y centrifugar a 11.000 g durante 5 minutos a 4°C .
4. Eliminar el etanol, y dejar secar el ARN en hielo.
5. Disolver el ARN en 100 μl de H_2O DEPC (Ambion).

8.2. Purificación del ARN.

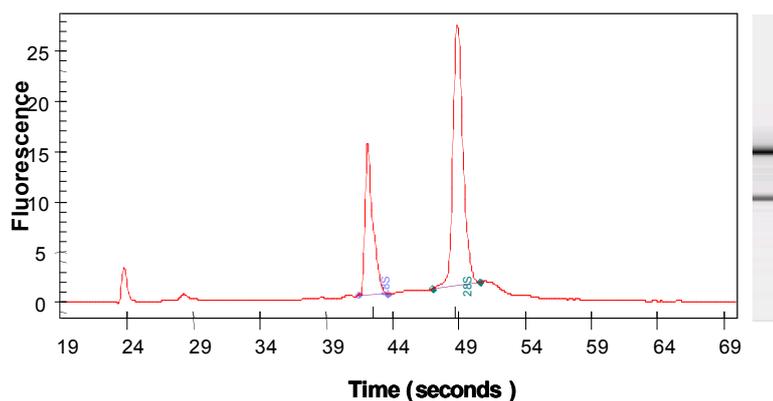
Con este proceso se pretende mejorar la calidad del ARN y asegurar una mejor hibridación sobre los microarrays de Affymetrix®. Se realizó mediante las columnas "RNeasy® Mini", (Qiagen, Valencia, CA).

Reactivos y procedimiento:

1. Añadir 350 μl de *solución RLT* y mezclar.
2. Añadir 250 μl de etanol 100% y mezclar.
3. Pasar el volumen total a una columna de purificación.
4. Centrifugar a 9.000 *g* durante 15 segundos.
5. Lavar con 500 μl de *solución RPE*.
6. Centrifugar a 9.000 *g* durante 15 segundos.
7. Repetir el lavado con *RPE*.
8. Añadir 30 μl de agua DEPC, y pasar el ARN a un tubo nuevo.

8.3. Medida de la concentración y calidad del ARN

La evaluación de la integridad del ARN es un paso crítico en los análisis de la expresión génica. Para medir la concentración y al mismo tiempo valorar la calidad del ARN, se utilizó el sistema de Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Palo Alto, CA) con el kit "RNA 6000 Nano LabChip", en el que se pueden medir hasta 12 muestras (1 μl por cada una) en un rango de concentración entre 25 y 250 $\text{ng}/\mu\text{l}$.



Fragment	Star Time	End Time	Area	% of total Area
18S	41.47	43.66	24.14	20.16
28S	47.04	50.59	46.76	39.06

RNA Area: 119.71
RNA Concentration($\text{ng}/\mu\text{l}$): 340.63
rRNA Ratio [28S / 18S]: 1.94

Figura 16: Cuantificación de ARN y determinación de su calidad.

Para cada muestra el bioanalizador calcula automáticamente la relación entre las áreas de las bandas ribosomales 28S y 18S, que idealmente debe estar entre 1,8 y 2,1. Este valor puede ser utilizado como un parámetro de la calidad de la muestra. La variación de esta ratio puede indicar degradación parcial de la muestra o contaminación de la misma. En los casos de completa degradación las bandas llegan a desaparecer.

Los picos más diferenciados y de mayor tamaño se corresponden con las fracciones ribosómicas 18S y 28S. La línea entre 29S y la fracción 18S ha de ser prácticamente recta y los picos pequeños corresponden a pequeñas moléculas de ARN (Figura 16).

8.4. Síntesis de ADNc a partir del ARN total

En todos los casos se partió de 3 µg de ARN total. Se utilizó el kit de Affymetrix: "One Cycle cDNA Synthesis".

8.4.1. Síntesis de la primera hebra de ADNc:

Reactivos y procedimiento:

1. Mezclar en un tubo eppendorf la muestra (ARN) y el primer T7-(dT)₂₄:
2. Incubar a 70°C durante 10 minutos.
3. Enfriar la reacción en hielo durante 2 minutos.
4. Añadir: 5X First Strand cDNA Buffer, DTT (0,1 M), dNTP mix (10 mM).
5. Incubar durante 2 minutos a 42°C.
6. Añadir 1.5 µl de *SuperScript II RT*.
7. Mezclar bien los reactivos y e incubar durante 1 hora a 42°C.

8.4.2. Síntesis de la segunda hebra de ADNc:

1. Enfríar la reacción.
2. Añadir: H₂O DEPC, 5X Second Strand Reaction Buffer, dNTP mix (10 mM)

DNA Ligase (10 U/μl), DNA Polymerase I (10 U/μl), RNase H.

3. Mezclar bien, e incubar a 16°C durante 2 horas.
4. Añadir 2 μl (10 U/μl) de *T4 DNA Polymerase*.
5. Incubar 5 minutos más a 16°C.
6. Añadir 10 μl de 0,5 M de EDTA.

8.4.3. Purificación de la doble hebra de ADNc:

Se realiza a temperatura ambiente.

PLG (Phase Lock Gels)-Extracción con Fenol/Cloroformo:

En la purificación con fenol/cloroformo, *PLG* forma una barrera inerte entre las fases acuosa y orgánica. A este gel, en alícuotas de 1,5 ml, se añaden la muestra y el fenol/cloroformo.

1. Añadir el mismo volumen que el que tenemos de ADNc de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) a la muestra de ADNc y pasar al tubo *PLG*.
2. Centrifugar el tubo de *PLG* a 13.000 *g*. durante 20-30 segundos, para precipitar el gel.
3. Transferir todo el volumen a otro tubo de *PLG*.
4. No mezclar con vortex, este gel no debe llegar a ser parte de la suspensión. Centrifugar a 13.000 *g* durante 2 minutos.

5. Transferir la fase acuosa que contiene el ADN a un tubo nuevo de 1,5 ml.

Precipitación del ADN con etanol:

1. Añadir 0,5 volúmenes de NH₄AC 7,5 M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío a la muestra y mezclar.

2. Centrifugar a 13.000 g durante 20 minutos a temperatura ambiente.

3. Eliminar el sobrenadante y lavar el sedimento dos veces con 0,5 µl de etanol frío al 80%.

4. Centrifugar a 13.000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente.

6. Dejar secar el ADN.

7. Resuspender en 12 µl de agua DEPC.

Comprobar la síntesis del ADNc en un gel de agarosa.

8.4.4. Gel agarosa.

Reactivos y procedimiento:

Disolver 0,8 gr de agarosa (MS-12: Pronadisa) en 50 ml de TBE (Tris base 0,004 M, ácido bórico 0,001 M; EDTA 0,5 M; pH 8) con BrEt (0,5 mg/mL), para hacer un gel al 1,6%.

8.5. Síntesis de ARNc marcado con biotina. Purificación y fragmentación.

Una vez que sintetizado el ADNc de doble cadena, se realizó una transcripción *in vitro* (IVT) y marcado fluorescente mediante el kit de Enzo®. El resultado es una amplificación lineal (entre 40-80 veces) del ARN.

8.5.1. Transcripción "in vitro": IVT.

Reactivos y procedimiento:

1. Mezclar el ADNc con 10X HY Reaction Buffer, 10X Biotin Labeled ribonucleotides, 10X DTT, 10X RNase Inhibitor Mix, 20X T7 RNA Polymerase.
2. Incubar a 37°C en un baño durante 5 horas, mezclando cada 45 minutos.
3. Una vez transcurrido el periodo de incubación, seguir con el proceso de purificación como se ha descrito en el apartado 6.2.

8.5.2. Cuantificación del ARNc:

La concentración del ARNc se determina midiendo la absorbancia a 260 nm (A_{260}) en un espectrofotómetro. Hay que tener en cuenta que la absorbancia de una unidad a 260 nm se corresponde con 40 µg de ARN por ml. $[\text{ARN}] (\mu\text{g/ml}) = 40 \times A_{260} \times \text{factor de dilución}$. La relación entre los valores A_{260}/A_{280} debe ser aproximadamente 2. Los rangos entre 1,65 – 2,2 también son aceptables, para tener un ARN de buena calidad.

Comprobamos este ARNc en un gel de agarosa al 1%.

8.5.3. Fragmentación del ARNc:

Posteriormente se procede a la fragmentación de 25 µg de ARNc a 95°C con MgCl_2 a 10 mM, en este proceso se obtienen fragmentos de ARNc entre 35 y 200 pares de bases, que son los óptimos para la correcta hibridación en los chips.

Affymetrix recomienda que el ARN utilizado en la fragmentación debe estar lo suficientemente concentrado (como mínimo una concentración de 0,6 µg/µl) para mantener un volumen pequeño durante este proceso.

Reactivos y procedimiento:

1. Añadir 2 μ l del 5X *Fragmentation Buffer* (200 mM Tris-acetate pH 8,1, 500 mM KOAc, 150 mM MgOAc) por cada 8 μ l de ARNc.
2. Incubar a 94°C durante 35 minutos. Enfriar en hielo después de la incubación.
3. Guardar una alícuota con al menos 1 μ g de este ARNc fragmentado para correr en un gel de agarosa.

8.6. Hibridación, tinción y lavado de los arrays de Affymetrix®: Test3 y HG-U133 Plus 2

Se hibridaron 15 μ g del ARNc fragmentado, junto con los controles internos de la transcripción, hibridación y marcaje en el array de Affymetrix® durante 16 horas a 45°C con rotación constante a 0,4 g. Después de la hibridación, se realizó la tinción que incluye estreptavidina-ficoeritrina (SAPE) (10 μ g/ μ l) y anticuerpos anti-estreptavidina biotinilados (3 μ g/ μ l). Tras las tinciones y lavados, estos chips fueron escaneados con un "Agilent GeneArray Scanner Versión G2.500A", cada chip fue escaneado dos veces, durante 5 minutos cada vez y el resultado se comprobó con el programa Microarray Suite 5.0 (MAS 5.0, Affymetrix), con el que también se realizaron los análisis de las intensidades absolutas de cada sonda.

8.6.1. Test 3:

Antes de la hibridación de los chips humanos (HG-U133 Plus 2) se hibridan los test, que proporcionan información sobre el estado del ARNc fragmentado. Los chips comerciales tipo Test3 contienen únicamente genes control, necesarios para el proceso celular en un amplio rango de tipos celulares y tejidos, y cuya expresión no depende del estado de desarrollo, físico o patológico de la célula, como GAPDH y otros genes que no pertenecen al organismo en estudio.

8.6.2. GeneChip Human Genome-U133 Plus 2

El protocolo de hibridación del HG-U133 Plus 2 es igual al de hibridación del Test3. Se utilizan los 15 µg de ARN usados en la hibridación del Test3.

8.7. Análisis de los datos:

Los valores de expresión absolutos para cada sonda se calcularon mediante el software MAS 5.0. En todos los casos se cumplían los criterios de una hibridación de buena calidad: *Scaling factor* (SF) menor de tres veces, es decir, el SF más elevado no superaba en 3 veces al más bajo; proporción entre la señal del extremo 3' de GAPDH y el extremo 5' inferior a 2,5; y número de sondas presentes en el chip superior al 40%.

Los análisis comparativos se realizaron mediante el programa Dchip (Harvard School of Public Health and Dana-Farber Cancer Institute) y el software Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity Systems, Redwood, CA). Los genes con cambios de expresión superiores a 2 veces (FC: *Fold Change*) tanto en sentido positivo como negativo se consideraron significativos.

Los colorgramas funcionales se realizaron con el "software" GeneCluster2 (Cancer genomics Group, Whitehead Institute for Biomedical Research).

9- Western Blot.

9.1. Obtención de la fracción proteica.

Para obtener la fracción proteica total utilizamos 10^7 células por tratamiento (10^6 células/ml).

Reactivos:

- Tampón de lisis: NaCl 140 mM, EDTA 10 mM, glicerina 10%, Nonidet P-40 1%, Tris pH 8,0 20 mM, PMSF 1mM, pepstatina 1 µg/ml, aprotinina 1 µg/ml, leupeptina 1 µg/ml, sodio ortovanadato 1 mM.

Procedimiento:

1. Una vez transcurrido el tiempo de incubación con cada fármaco (de 1 a 48 horas), recoger y centrifugar a 300 *g* durante 3 minutos.
2. Lavar con PBS frío.
3. Añadir 800 µl de tampón de lisis, centrifugación a 15.000 *g* durante 10 minutos a 4°C.
4. El sobrenadante que contiene las proteínas se recoge y se conserva a -20°C.

9.2. Cuantificación protéica de los extractos celulares.

Se utilizó el método diseñado por Bradford.

Reactivos:

- Bio-Rad Protein Assay.
- BSA (seroalbúmina bovina)

Procedimiento:

1. Preparar alícuotas con BSA a 0, 100, 250, 500 y 750 µg/ml, para la recta patrón.
2. Diluir cada muestra en 1 ml de *Bio-Rad Protein Assay*.
3. Medir la absorbancia en el espectrofotómetro, que es directamente proporcional a la cantidad de proteína.

9.3. Electroforesis en geles de acrilamida.

Los extractos una vez cuantificados, se utilizaron para realizar la electroforesis.

La técnica llamada SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis*) permite separar las proteínas de una muestra en función de su tamaño, mediante la aplicación de un campo eléctrico.

Reactivos:

- Acrilamida:Bisacrilamida.
- Tris-HCl pH 8,8, 1,5M.
- Tris-HCl pH 6,8, 1M.
- TEMED
- APS (persulfato amónico)
- Tampón de carga: 200 mM Tris-HCl pH 6,8, 8% SDS, 40% glicerol, 0,05% azul de bromofenol y 5% β -mercaptoetanol.
- Tampón electrodo 1X: 25mM Tris -HCl pH 8,3, 192 mM glicina y 0,1%SDS.
- Marcador de peso molecular de amplio rango (6,5-200 KDa) (BioRad).

Procedimiento:

1. Los geles se prepararon según *Laemmli*, a un determinado porcentaje entre el 6 y 12% de acrilamida, en función del peso molecular de la proteína.
2. Mezclar la muestra con tampón de carga y calentar durante 3-5 minutos a 100°C antes de cargar en el gel. El tampón de carga es desnaturizante y el SDS que contiene confiere carga neta negativa a las proteínas.

3. La electroforesis se realizó con tampón de electrodo 1X, en cubetas Mini-PROTEAN®III (Bio-Rad), o en cubetas grandes de tipo Sturdier, a voltaje constante de hasta 120 V o 200 V respectivamente.

9.4. Transferencia de proteínas a una membrana de PVDF.

Después de correr la electroforesis las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF (Polivinilideno difluoruro).

Reactivos:

- Tampón de transferencia 1X: 20 mM Tris, 192 mM glicina, 0,02% SDS y 10% metanol.
- Membranas de PVDF (Immobilon-P®, Millipore).

Procedimiento:

La transferencia se realiza a una corriente constante de 500 mA durante un tiempo variable en función del grosor y porcentaje de acrilamida del gel.

9.5. Bloqueo, marcaje con anticuerpos y revelado.

Reactivos:

- Tampón de bloqueo TBST-BSA (Tris 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween 20 0,1%; BSA 1%, N₃Na 0.05%).
- Tampón de lavado TBST (Tris 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween 20 0,1%).
- Anticuerpos primarios: Se especifican en los capítulos correspondientes.
- Anticuerpos secundarios: IgG anti-conejo-HRP e IgG anti-ratón-HRP (Amershan).

- Solución de revelado: TRIS 0,1 M pH: 9,35, Luminol, *p*-Iodophenol, H₂O₂ (1:20.000)

Procedimiento:

1. Bloquear la membrana al menos durante una hora a temperatura ambiente.
2. Incubar al menos 2 horas con el anticuerpo correspondiente diluido en TBST.
3. Lavar las membranas con TBST (3 lavados de 7 minutos).
4. Incubar con el correspondiente anticuerpo secundario, durante 30 minutos.
5. Lavar las membranas con TBST (3 lavados de 7 minutos).
6. Incubar 1 minuto con la solución de revelado.
7. Revelar.

9.7. Extracción proteica de las fracciones citosólica, mitocondrial y nuclear.

Reactivos:

- Tampón de lisis de homogenización (LH): Hepes pH 7,5, 20 mM, Mg Cl₂ 1,5 mM, KCl 10 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, DTT 1 mM, Sacarosa 250 mM, PMSF 1mM, pepstatina 1 µg/ml, aprotinina 1 µg/ml, leupeptina 1 µg/ml, sodio ortovanadato 1 mM.

Procedimiento:

1. Recoger y centrifugar las células (30 x 10⁶ de células por tratamiento (1 x 10⁶ células/ml) a 300 g durante 3 minutos.
2. Lavar 2 veces con PBS frío y resuspender en 1.500 µl de tampón de lisis de homogeneización.
3. Pasar las células por un homogeneizador manual 60 veces.

4. Centrifugar a 700 *g* durante 10 minutos a 4°C.
5. Recoger el sobrenadante que contiene la fracción citoplasmática, (en el botón celular quedan los núcleos).
6. Centrifugar a 10.000 *g*, durante 25 minutos a 4°C, el sedimento contiene las mitocondrias que se resuspenden en 130 μ l de LH.
7. Centrifugar el sobrenadante a 100.000 *g*, durante 1 hora a 4°C.
8. Recoger el sobrenadante que contiene la fracción citosólica y añadir 1.300 μ l de LH.
9. Los extractos se conservaron a -20 °C.

CAPÍTULO 1: Bortezomib en LAM

La vía de ubiquitina-proteasoma juega un papel fundamental en la homeostasis celular al actuar como uno de los reguladores claves de la proliferación y la apoptosis. La inhibición de los proteasomas representa una nueva modalidad de terapia antitumoral,⁴⁹⁸ siendo el Bortezomib el primer inhibidor de proteasomas que ha alcanzado la clínica. Los efectos antitumorales de Bortezomib han sido demostrados *in vitro* e *in vivo* en varias patologías, como el mieloma múltiple,^{499, 500} y otras enfermedades hematológicas.⁵⁰¹⁻⁵⁰³ Además, el Bortezomib puede potenciar el efecto antineoplásico de otros fármacos.⁵⁰⁴⁻⁵⁰⁸ En este capítulo presentamos el efecto y mecanismo de acción del Bortezomib en líneas celulares y en células obtenidas de pacientes diagnosticados de Leucemia Aguda Mieloblástica.

Bortezomib presentó una potente actividad antileucémica con concentraciones inhibitorias mínimas (IC50) menores de 50nM para las cuatro líneas de LAM estudiadas, dichas concentraciones fueron sensiblemente menores que las IC50 para los fármacos tradicionalmente empleados en el tratamiento de las LAM como Doxorubicina, Citarabina y Fludarabina. En línea con los experimentos en otras neoplasias, Bortezomib presenta un efecto sinérgico con quimioterápicos como la Citarabina y la Doxorubicina, con índices de combinación medidos por el método de Chou-Talalay menores de 1.⁵⁰⁹ A nivel de mecanismo de acción, Bortezomib provoca una parada en el ciclo celular en las fases G2/M debido a aumento de niveles de p27 y una muerte por apoptosis por vías dependientes e independientes de caspasas.

En los estudios *ex vivo* en muestras obtenidas de pacientes en el momento del diagnóstico de las LAM, Bortezomib fue eficaz, mostrando un claro efecto

proapoptótico. Además, al analizar las distintas subpoblaciones de células blásticas mediante antígenos de inmadurez y de madurez, y realizar un estudio de muerte celular en ellas, se comprobó como Bortezomib presenta una actividad similar frente a las poblaciones blásticas más inmaduras (definidas como CD34+) como frente a las maduras, hecho que no ocurre con un agente clásico como la Doxorubicina. Estos estudios sugieren que Bortezomib puede vencer la resistencia a drogas asociada a fenotipos inmaduros. Los linfocitos normales residuales de cada una de las muestras y cuatro muestras de medula ósea fueron usados como control para evaluar la posible toxicidad de Bortezomib, mostrando baja inducción de apoptosis en dichas poblaciones.

Como conclusión, Bortezomib es un fármaco que muestra un potente y selectivo efecto antileucémico, por lo que sería un agente potencialmente útil en el tratamiento de las Leucemias Agudas Mieloblásticas, dicho papel deberá ser definido en ensayos clínicos.

The effect of the proteasome inhibitor bortezomib on acute myeloid leukemia cells and drug resistance associated with the CD34⁺ immature phenotype

Enrique Colado,^{1,2} Stela Álvarez-Fernández,² Patricia Maiso,² Jesús Martín-Sánchez,^{1,2} María Belén Vidriales,¹ Mercedes Garayoa,² Enrique M. Ocio,^{1,2} Juan Carlos Montero,² Atanasio Pandiella,² and Jesús F. San Miguel^{1,2}

¹Department of Hematology, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca; and ²Centro de Investigación del Cáncer, CSIC-Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain

EC, SA-F and PM contributed equally to this work.

Acknowledgments: we thank Johnson & Johnson Pharmaceutical Research & Development (JJPRD) and Millennium Pharmaceuticals Inc. for kindly providing bortezomib for the experiments.

*Manuscript received May 2, 2007.
Manuscript accepted July 20, 2007.*

*Correspondence:
Jesus. F. San-Miguel,
Dpt. Haematology, University
Salamanca.
E-mail: sanmigiz@aida.usal.es*

ABSTRACT

Background

Proteasome inhibition represents a promising novel anticancer therapy, and bortezomib is a highly selective reversible inhibitor of the proteasome complex. Acute myeloid leukemia (AML) is an immunophenotypically heterogeneous group of diseases, with CD34⁺ cases being associated with drug resistance and poor outcome. We investigated the effects of bortezomib on the growth and survival of AML cells.

Design and Methods

We studied the *in vitro* activity and mechanism of action of bortezomib on both cell lines and fresh cells from 28 AML patients including CD34⁺ and CD34⁻ cases.

Results

Bortezomib showed potent anti-AML activity (IC₅₀ < 50 nM), which was greater than that of conventional agents (doxorubicin, cytarabine and fludarabine). Moreover, synergistic effects were observed when bortezomib was administered in combination with doxorubicin and cytarabine. Mechanistically, bortezomib induced accumulation of cells in the G₂/M phase, with up-regulation of p27, together with cell death through an increase in the mitochondrial outer membrane permeability involving caspase-dependent and -independent pathways. The apoptotic activity of bortezomib on fresh CD34⁺ blast cells from patients was similar to that observed on CD34⁻ blast cells. Importantly, bortezomib was significantly more active than doxorubicin in the immature CD34⁺ cells, while there were no differences in its action on CD34⁻ cells.

Conclusions

Bortezomib induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells *in vitro*. Whether this drug might be useful in the treatment of patients with acute myeloid leukemia can be established only in *ad hoc* clinical trials.

Key words: bortezomib, acute myeloid leukemia, CD34.

Citation: Colado E, Álvarez-Fernández S, Maiso P, Martín-Sánchez J, Vidriales MB, Garayoa M, Ocio EM, Montero JC, Pandiella A, San Miguel JF. The effect of proteasome inhibitor bortezomib on acute myeloid leukemia cells and drug resistance associated with the CD34⁺ immature phenotype. Haematologica. 2008 Jan; 93(1):57-66. DOI: 10.3324/haematol.11666

©2008 Ferrata Storti Foundation. This is an open-access paper.

Introduction

The ubiquitin–proteasome pathway plays a fundamental role in cellular homeostasis as a critical regulator of cell proliferation and apoptosis. For this reason, the proteasome represents an attractive target for therapeutic intervention in cancer patients,¹ and this is supported by the results obtained in different malignancies with the proteasome inhibitor bortezomib (Velcade®, formerly PS-341), which is a highly selective, reversible inhibitor of the 26S subunit of the proteasome complex.² Studies on the mechanism of action of bortezomib have indicated that this drug stabilizes p21, p27 and p53, as well as the pro-apoptotic Bid and Bax proteins, caveolin-1 and IκB-α.^{3,4} The last protein prevents activation of NFκB-induced cell survival pathways in several cellular systems, including a multiple myeloma model.⁵ The anticancer effects of bortezomib have been demonstrated *in vitro* and *in vivo* for different malignancies such as multiple myeloma,^{6,7} adult T-cell leukemia,⁸ melanoma,⁹ lung,^{10,11} breast,¹² pancreatic,^{13,14} prostate,^{15,16} ovarian,¹⁷ head and neck,¹⁸ and colon cancer.¹⁹ Moreover, several *in vitro* experiments have also shown that bortezomib enhances the antitumor properties of various antineoplastic drugs.^{20–25}

Clinical investigations concerning the efficacy and safety of bortezomib alone or in combination with chemotherapy in multiple myeloma have been completed^{26,27} and bortezomib was approved in 2003 for the treatment of relapsed and refractory multiple myeloma.²⁸ More recently, bortezomib was also approved for the treatment of mantle cell lymphoma. As far as concerns acute myeloid leukemia (AML), three small clinical trials have been conducted;^{29–31} in two of them, bortezomib was combined with conventional agents,^{30,31} and in one it was used as a single agent, but only modest and transient antileukemic activity was observed.²⁹

In spite of these data, there is little information on the *in vitro* activity and mechanism of action of bortezomib in AML to support its clinical use. This is important, particularly due to the heterogeneity of AML, including a wide array of genetic lesions and immunophenotypic profiles. The CD34 antigen identifies early progenitor cells and, accordingly, AML can be divided into immature and mature forms (CD34⁺ and CD34⁻, respectively), the former subset associated with drug resistance and poorer outcome,^{32–35} as compared to the more mature CD34⁻ cases. Moreover, at relapse, blast cells usually display a more immature phenotype, as a reflection of drug resistance.^{36,37} In fact, it has been suggested that the presence of an immature phenotype,^{32,35} together with age and cytogenetics represent important prognostic factors in AML.³⁸ On this background, we carried out a detailed analysis of the *in vitro* activity and mechanism of action of bortezomib on AML cells using both cell lines and fresh cells from patients including CD34⁺ and CD34⁻

cases. In addition, we compared the activity of bortezomib with that of conventional agents used for the treatment of AML.

Design and Methods

Reagents and immunochemicals

Cell culture media, serum and penicillin-streptomycin were purchased from Invitrogen Corporation (Gaithersburg, MD, USA). Bortezomib (formerly known as PS-341; Millenium Pharmaceuticals Inc. Cambridge, MA, USA) was dissolved in DMSO and stored at –20°C until use. Doxorubicin, cytarabine (ara-C) and fludarabine were purchased from Sigma (USA). Annexin V-FITC was obtained from Becton Dickinson (San Diego, CA, USA). Calpeptin and Z-VAD-FMK were from Calbiochem (San Diego, CA, USA). Other generic chemicals were purchased from Sigma Chemical Co., Roche Biochemicals (Mannheim, Germany), or Merck (Darmstadt, Germany). The origins of the different monoclonal antibodies employed in the western blotting analyses were as follows: the anti-p21, anti-pErk, anti-Erk1/2, and anti-caspase-3, were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA); anti-Apaf-1, anti-caspase-8, anti-caspase-9, anti-AIF, anti-Bcl-X, anti-PARP, anti-Bcl-2, anti-Cdk4 and anti-cyclin D1 antibodies were from Becton Dickinson, anti-p53 antibody was from Calbiochem Science, and the HRP-conjugated secondary antibodies were from Bio-Rad.

Cell lines: cell proliferation, cell cycle and apoptosis assays

All AML cell lines (HEL, KG-1, MV4-11 and HL-60) were cultured in RPMI 1640 containing 10% fetal-bovine serum (Gibco), 2x10⁻⁵ M glutamine, 100 units/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin at 37°C in a humidified atmosphere in the presence of 5% CO₂-95% air. HL60 cells were derived from a patient with FAB M2 AML, the HEL and KG-1 cell lines were derived from patients with erythroid leukemia (FAB M6), while the source of MV4-11 was a patient with myelomonocytic leukemia (FAB M4). The proliferation of AML cells was examined using MTT colorimetric assays as described elsewhere.^{39,40} Pilot studies were conducted on all the AML cell lines to optimize cell concentrations and incubation times with the different drugs. Interactions between bortezomib and other anti-AML drugs were analyzed using the Calculusyn software program (Biosoft, Ferguson, MO, USA). Data from cell viability assays (MTT) are expressed as a fraction of cells with growth affected (FA) in drug-treated versus untreated cells. This program is based upon the Chou and Talalay method.^{41,42} For flow cytometric evaluation of apoptosis, 1 10⁶ of HEL cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and resuspended in binding buffer (10 mM

Hepes/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂). Cells were incubated with 5 μ L of annexin-V-FITC for 15 min at room temperature in the dark, and then 10 μ L of propidium iodide (PI) were added.

To obtain a quantitative evaluation of the mitochondrial transmembrane potential (Ψ_m), cells were incubated in PBS with 20 nM 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide [DiOC6(3)] (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) for 20 min at 37°C in the dark, washed with PBS and, then, following addition of 10 μ L PI (Calbiochem, San Diego, CA, USA) underwent flow activated cell sorting (FACS) on a FACScalibur flow cytometer (BD Biosciences) and analysis with the Paint-a-gate program.

To analyze the cell cycle distribution, cells were made permeable by the addition of 70% ethanol for 4 h at 4°C and stained with PI in the presence of 5 μ g/mL RNase (Sigma). Ten thousand events were acquired on a FACScalibur flow cytometer (BD Biosciences) and analyzed with the Paint-a-Gate program.

Western blotting

Cell lines were treated with 50 nM of Bortezomib and were collected and centrifuged at 10,000 \times g for 2 min. The cells were then washed with PBS and lysed in ice-cold lysis buffer (140 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10% glycerol, 1% Nonidet P-40, 20 mM Tris (pH 7.0), 1 μ M pepstatin, 1 μ g/mL aprotinin, 1 μ g/mL leupeptin, 1 mM sodium orthovanadate). Samples were centrifuged at 10,000 \times g at 4°C for 10 min and supernatants were transferred to new tubes.

Subcellular fractionation

HEL cells were harvested in isotonic mitochondrial buffer (250 mM sucrose, 20 mM HEPES, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 μ M pepstatin, 1 μ g/mL aprotinin, 1 μ g/mL leupeptin, 1 mM sodium orthovanadate) and Dounce homogenized by 60-70 strokes. Samples were transferred to Eppendorf tubes and centrifuged at 770 \times g for 10 min at 4°C to separate nuclei and unbroken cells. The resulting supernatant was centrifuged at 10,000 \times g for 25 min at 4°C to obtain the mitochondrial pellet. The supernatant was further centrifuged at 100,000 \times g for 1 hour at 4°C to yield the final soluble cytosolic fraction.

Patients' samples and apoptosis assays

For cytometric analyses of apoptosis in bone marrow (BM), cell subpopulations from 29 AML patients, excluding those with acute promyelocytic leukemia, were obtained at diagnosis before any treatment. Both CD34⁺ and CD34⁻ cells co-existed in nine cases. In seven cases, all blast cells were CD34⁺, while in the other 13 samples, they were all CD34⁻. Accordingly, a total of 16 samples had a significant CD34⁺ population, either as a pure population or in a mixture, and in 22 samples a CD34⁻ population was identified and available for investigation of drug-induced antitumor activity. The multiparametric flow cytometry

analysis of the CD34⁻ populations showed that in all cases, these populations were immunophenotypically more mature cells based on the expression of different maturation antigens (CD15, CD11b, CD64, CD14, CD65, cMPO, CD45⁺). The average age of the patients was 64 \pm 12 years (mean \pm SD). Cytogenetic information was available for 22 samples (7 complex karyotype or 11q23; 15 normal risk karyotypes), the remaining seven patients had no mitoses. According to the FAB classification, the distribution of cases was as follows: two M0, (7%); eight M1, (28%); five M2, (17%); four M4, (14%); eight M5 (28%); one M6, (4%) and one case was considered not classifiable. Patients were treated according to the Spanish Cooperative PETHEMA group's protocols LAM99 <65 (n=19), and LAM99>65 (n=1), and 68% (n=14) of 20 evaluable patients achieved morphological complete remission. The remaining patients (n=9) were considered to have received only supportive care, due to older age.

Mononuclear cells (MNC) were isolated by a Ficoll-Hipaque density sedimentation and maintained in IMDM containing 15% FCS; the percentage of blasts after purification was 88 \pm 9%. To consider a MNC sample as valid, it had to have less than 5% trypan blue-positive cells at arrival at our laboratory, and, after incubation for 18 h with drugs, there had to be less than 40% annexin V positive events in the control. In order to analyze the apoptotic activity of bortezomib and to compare it with that of doxorubicin and cytarabine, 1 \times 10⁶ BM cells were incubated in six-well plates with bortezomib (50 nM), doxorubicin (1 μ M) or cytarabine (1 μ M), or without any drug (control) for 18 h at 37 °C in a humidified atmosphere in the presence of 5% CO₂-95% air. The drug concentrations were selected based on the median plasma levels achieved in patients for these drugs and our results in cell lines. Subsequently, cells were incubated for 15 min at room temperature in the dark with 5 μ L annexin-V-FITC (Bender MedSystems, Burlingame, CA, USA) together with a combination of monoclonal antibodies: anti-CD33-PE, anti-CD34-PerCP, anti-CD45-APC (BD Biosciences). A total of 50,000 cells were acquired on a FACScalibur flow cytometer (BD Biosciences) and analyzed with the Paint-a-Gate program. Using quadruple staining (annexin V/CD33/CD34/CD45), we were able to identify and distinguish the most immature blast cell population (CD34⁺, CD45^{dim}) from the more mature blast cell population (CD33⁺, CD34⁻) and normal residual lymphocytes (CD45⁺, SSC^{lo}). The number of apoptotic cells was measured in each cell population. The percentage of apoptotic events was corrected according to the proportion of apoptotic cells in the control tube (to which no drug was added).

Statistical analysis

The percentage of apoptotic cells referred to the viable fraction of cells, which was calculated using the control tube, for normalization in order to reduce the variability among samples. Induction of apoptosis (annexin V⁺

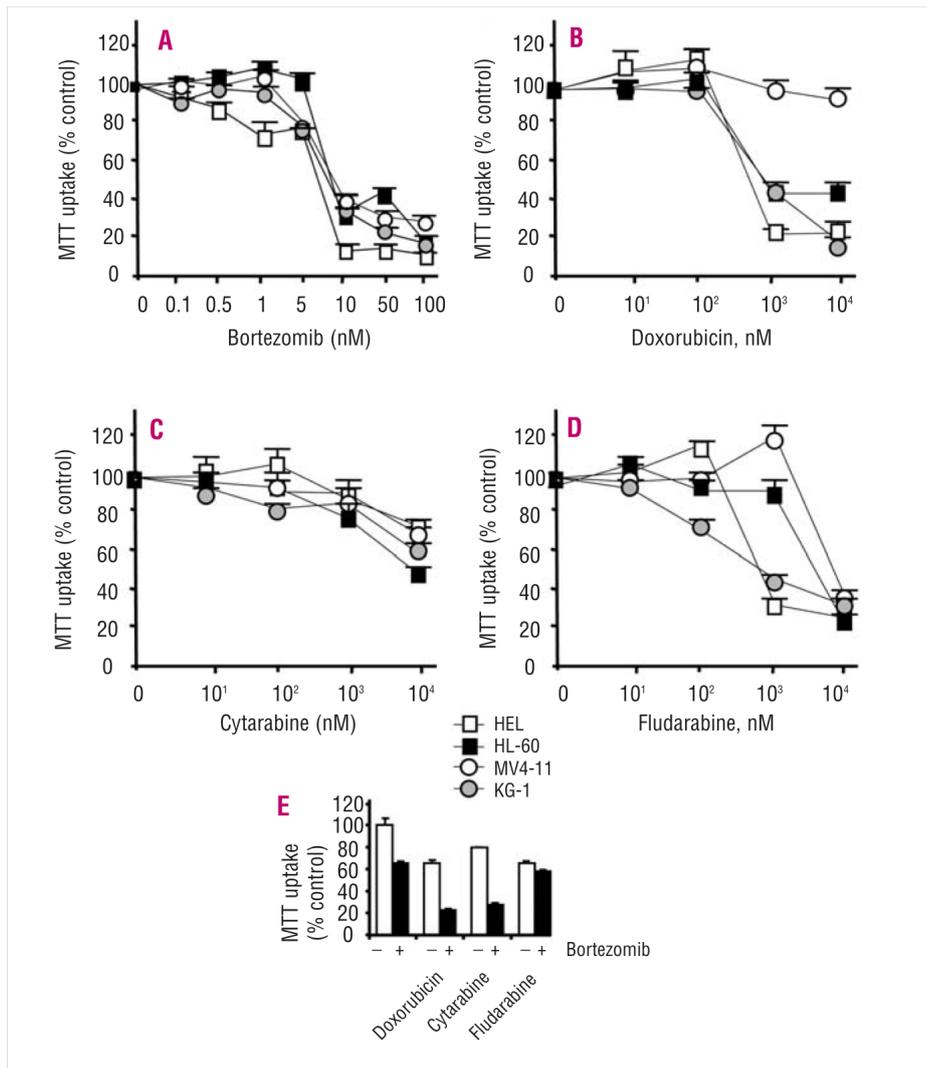


Figure 1. Effect of bortezomib on the proliferation of acute myeloid leukemia cells. MTT uptakes of acute myeloid leukemia cell lines incubated with different doses of bortezomib (A), doxorubicin (B), cytarabine (C), and fludarabine (D). Cells were plated at identical densities in 96-well dishes. Bortezomib, doxorubicin, cytarabine and fludarabine were added at the indicated concentrations. MTT uptake assays were performed 48 hours later as described in the *Design and Methods* section. The average proliferation values of control untreated samples were taken as 100%. Data are represented as the mean \pm SD of quadruplicates of an experiment that was repeated at least twice. (E) Bortezomib (15 nM) was combined with doxorubicin (250 nM), cytarabine (250 nM) or fludarabine (250 nM) and 48 hours later, MTT assays were done in HEL cells.

events) was calculated on the total blast cell population, CD34⁺ blast cells, CD34⁻ blast cells and normal residual lymphocytes. Statistical analyses were performed using the SPSS 11.0 statistical package.

Results

Activity of bortezomib in AML cell lines

To investigate the effect of bortezomib on the growth and survival of AML cells, we first used MTT assays on four different representative AML cell lines. Treatment with increasing doses of bortezomib (0.1-100 nM) for 48 hours potentially suppressed MTT uptake (Figure 1A), with IC₅₀ values between 5 nM and 10 nM for all four cell lines used. Comparisons of the IC₅₀ values of bortezomib with those of other drugs commonly used in AML indicated that bortezomib was clearly more potent than doxorubicin (Figure 1B), cytarabine (Figure 1C) and fludarabine (Figure 1D). MV4-11 was resistant to doxorubicin, and the IC₅₀ value for doxorubicin for HEL, HL60 and KG-1 were 500 nM, 1 μ M and 1 μ M, respectively. All cell lines

were resistant to pharmacological doses of cytarabine, and cell growth inhibition was only observed with micromolar concentrations. MV4-11 was resistant to fludarabine and growth inhibition appeared only at 10 μ M, while the IC₅₀ values for HEL and KG-1 were 500 nM, and that for the HL60 cell line, 3 μ M.

Bortezomib increases the action of doxorubicin and cytarabine

In order to investigate whether bortezomib could increase the activity of conventional drugs used in AML treatment, HEL cells were treated with several combinations of bortezomib and conventional drugs (doxorubicin, fludarabine and cytarabine). For these experiments, we used suboptimal doses of the compounds, and evaluated their combined effect by MTT absorbance assays, then analyzed the data using the Calcsyn program. As shown in Figure 1E, bortezomib was found to synergistically increase the anti-AML effect of doxorubicin (CI: 0.17) and cytarabine (CI: 0.51). However, bortezomib did not enhance the ability of fludarabine to inhibit the proliferation of HEL cells.

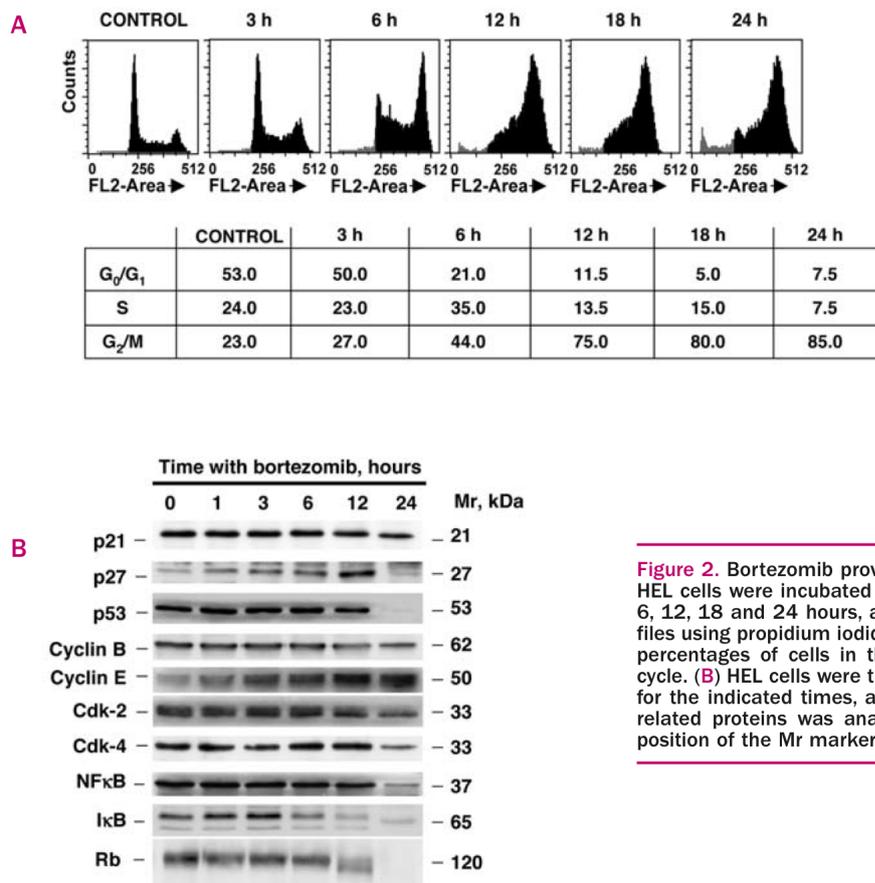


Figure 2. Bortezomib provokes G₂/M cell cycle arrest. (A) HEL cells were incubated with bortezomib (50 nM) for 3, 6, 12, 18 and 24 hours, and examined for cell cycle profiles using propidium iodide staining. The table shows the percentages of cells in the different phases of the cell cycle. (B) HEL cells were treated with bortezomib (50 nM) for the indicated times, and the expression of cell cycle-related proteins was analyzed by western blotting. The position of the Mr marker is shown at the right.

Bortezomib provokes cell cycle arrest in AML cells

We next evaluated whether the reduced MTT uptake observed in AML cell lines treated with bortezomib was due to stimulation of cell death or cell cycle arrest. HEL cells were cultured with bortezomib 50 nM for 0, 3, 6, 12, 18 and 24 hours and then cell cycle profile was analyzed by PI staining. As shown in Figure 2A, bortezomib caused an increase in G₂/M and a marked decrease in G₀/G₁ and S phases in a time-dependent manner. Analyses of several proteins implicated in cell cycle progression indicated that bortezomib decreased the levels of pRb, but rapidly increased the levels of p27 and cyclin E. Bortezomib also decreased the amount of IκB, and provoked a shift in the molecular weight towards a faster migrating form, likely representing dephosphorylated or underphosphorylated IκB. No major changes in p21, cyclin B, CDK2, CDK4, NFκB or p53 levels were observed, except at longer incubation times after which a decrease in most of these proteins was detected, probably due to massive protein degradation.

Bortezomib causes apoptosis in AML cells

We then investigated whether bortezomib caused apoptotic cell death. A significant, time-dependent induction of annexin V-positive cells was observed in HEL-cells after treatment with bortezomib (Figure 3A). Treatment with bortezomib also caused internucleoso-

mal DNA fragmentation indicative of cell death (Figure 3B). As mitochondria appear to be organelles critically involved in the triggering of apoptotic cell death, we explored whether bortezomib altered mitochondrial membrane potential (Ψ_m). Analysis of Ψ_m by the use of the mitochondrial membrane potential probe DioC₆(3) showed a decrease in Ψ_m in cells treated with bortezomib, suggesting that mitochondria were indeed affected in HEL cells treated with this compound (Figure 3C).

We next evaluated the biochemical parameters that are affected upon apoptotic cell death. Apoptosis triggered by bortezomib provoked cleavage of PARP, caspase-3, caspase-8 and caspase-9, with the generation of active low M_r cleaved fragments, (Figure 4A), suggesting that bortezomib exerts its effect by activating both the intrinsic and extrinsic caspase pathways. To investigate the importance of caspases in the anti-leukemic action of bortezomib, the ability of the caspase-3 inhibitor Z-VAD-FMK to rescue from cells from bortezomib-induced death was evaluated. HEL cells were preincubated for 60 minutes with Z-VAD-FMK, then bortezomib was added, and the incubation continued for 24 hours. As shown in Figure 4B, preincubation with the caspase-3 inhibitor blocked bortezomib-induced cell death. These results indicate that bortezomib activated the caspase-dependent apoptotic pathway, and that this activation was the main executor of cell death caused by this compound in

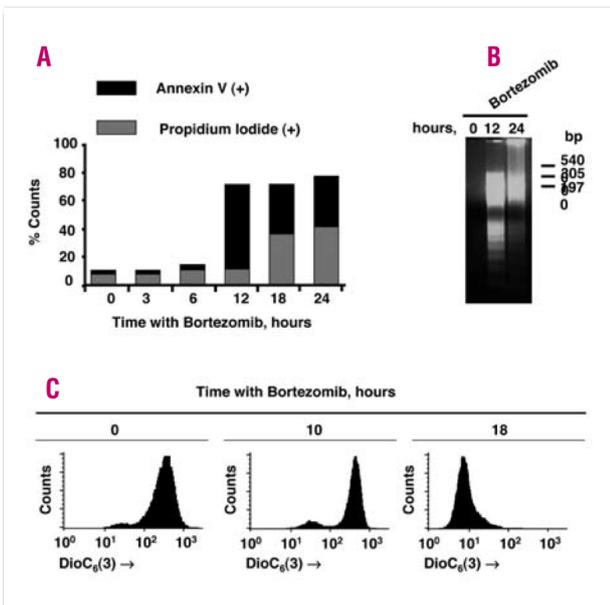


Figure 3. Bortezomib causes apoptotic cell death in an acute myeloid leukemia cell line. (A) Time-course of the effect of bortezomib on HEL cells. Cells were plated in 6-well plates, treated with bortezomib (10 nM), and 18 hours later, stained with annexin V-FITC and propidium iodide. (B) Bortezomib provokes internucleosomal DNA fragmentation, HEL cells were treated with bortezomib for the indicated times and DNA was isolated and analyzed by agarose gel electrophoresis. The position of the Mr markers is shown at the right. (C) Bortezomib induces $\Delta\Psi_m$ disruption. HEL cells were treated with bortezomib (50 nM), and the $\Delta\Psi_m$ analyses performed with [DiOC₆(3)] by flow cytometry.

HEL cells. Loss of Ψ_m often reflects increases in mitochondrial outer membrane permeability. Bcl-2 family members act as important regulators of mitochondrial outer membrane permeability. Western blot analyses indicated that bortezomib down-regulated the Bcl-2 family member BCLX, but not BCL2, and slightly increased MCL1 levels within the first 12 hours of treatment.

(Figure 4C). The increase in mitochondrial outer membrane permeability also favors the release of AIF, a mediator of caspase-independent cell death.⁴³ Subcellular fractionation of HEL cells treated for 18 hours with bortezomib showed that this drug caused a translocation of AIF from the mitochondrial to the cytosolic fraction after 18 hours of treatment (Figure 4D).

Bortezomib induces apoptosis in CD34⁺ and CD34⁻ cell populations from fresh AML samples

We used a multiparametric flow cytometry method to discriminate blast cells from normal residual lymphocytes, and, more interestingly, to discriminate between immature and more mature leukemic cell populations. The average percentage of apoptosis induced by bortezomib in the total blast cell of the whole series of 28 patients was 48±22% (mean±SD). In 14 samples, bortezomib induced apoptosis in ≥50% of leukemic cells. In 12 samples, between 50 and 20% of leukemic cells became apoptotic, and only in two samples was the level of apoptotic leukemic cells less than 20%. The apoptotic activity of bortezomib on CD34⁺ blast cells was similar to that observed in CD34⁻ blast cells (48±22% versus 57±27%, *p*=0.86; Figure 5A)

Bortezomib induces apoptosis more efficiently than doxorubicin and cytarabine in AML samples from patients

In a set of seven samples from AML patients, cytarabine (mean apoptosis induction±SD: 10±6%) was shown to be less cytotoxic than either bortezomib or doxorubicin (37±16% and 21±14%, respectively). For this reason, we decided to continue our experiments using only doxorubicin as the reference drug. When the effect of bortezomib was compared with that induced by doxorubicin, using both drugs at their optimal con-

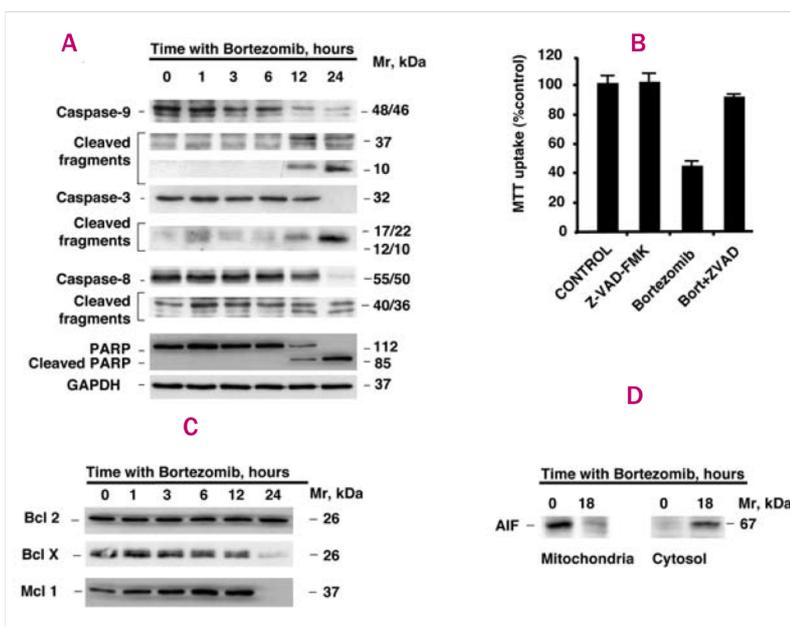


Figure 4. Effect of bortezomib on apoptotic pathways. (A) HEL cells were treated with bortezomib (50 nM) for the indicated times, and the expression of PARP, caspase-3, caspase-8 and caspase-9 proteins analyzed by western blotting. GAPDH was used as the loading control. (B) Effect of the pan-caspase inhibitor, Z-VAD-FMK, on bortezomib-induced cell death. HEL cells were plated and pre-treated, where indicated, with Z-VAD-FMK (20 μM) for 60 minutes. Bortezomib (50 nM) was added to the corresponding samples, and the experiment continued for 24 hours. MTT absorbance tests were carried out as described above. (C) The action of bortezomib on the levels of Bcl-2, Bcl-X and MCL-1 proteins. HEL cells were treated with bortezomib (50 nM) for the indicated times, and cell extracts were used for western blotting with anti-Bcl-2, anti-Bcl-X or anti-MCL-1 antibodies. (D) HEL cells were treated for the indicated times with bortezomib (50 nM), and the subcellular distribution of AIF in mitochondrial and cytosolic fractions was analyzed by western blotting.

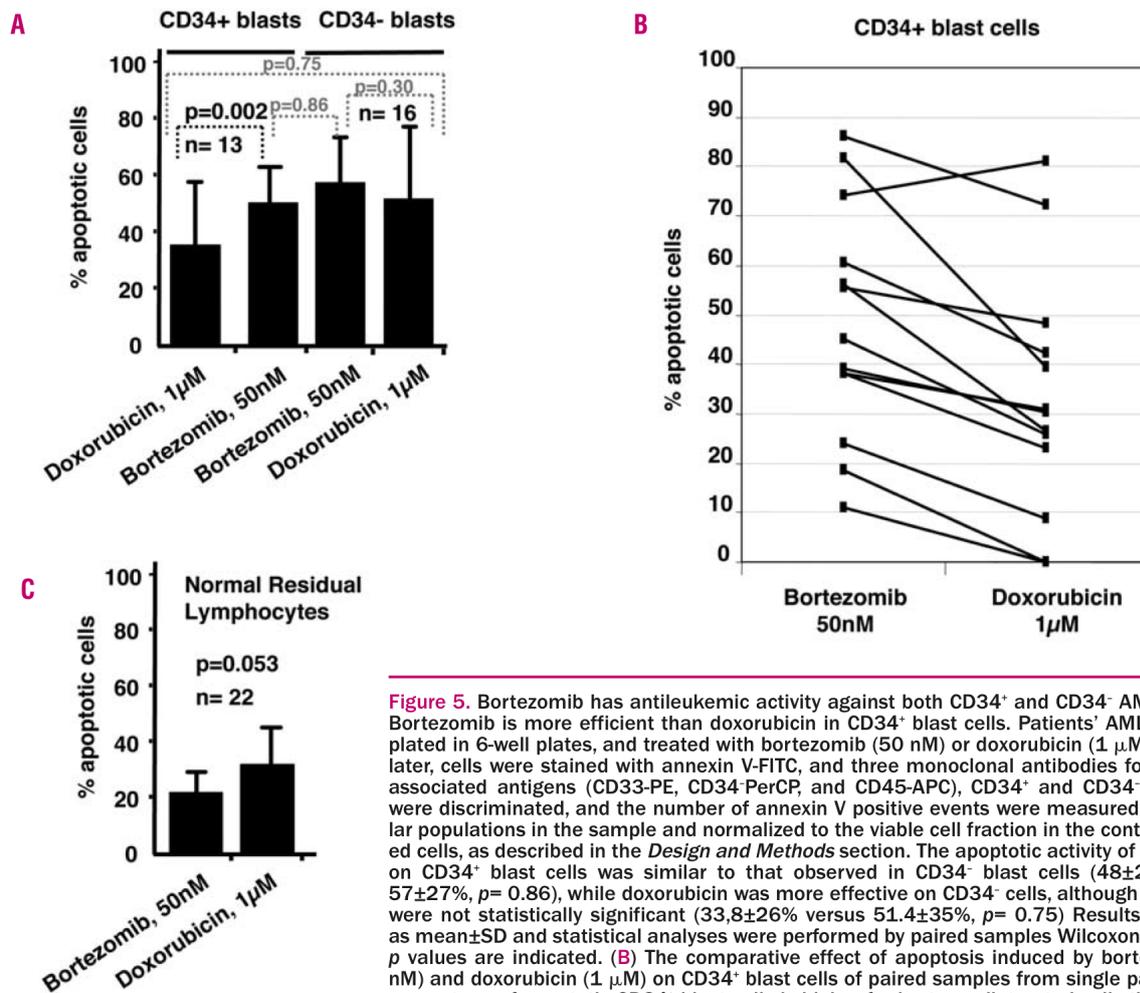


Figure 5. Bortezomib has antileukemic activity against both CD34⁺ and CD34⁻ AML cells. (A) Bortezomib is more efficient than doxorubicin in CD34⁺ blast cells. Patients' AML cells were plated in 6-well plates, and treated with bortezomib (50 nM) or doxorubicin (1 µM). 18 hours later, cells were stained with annexin V-FITC, and three monoclonal antibodies for leukemic-associated antigens (CD33-PE, CD34-PerCP, and CD45-APC). CD34⁺ and CD34⁻ blast cells were discriminated, and the number of annexin V positive events were measured in all cellular populations in the sample and normalized to the viable cell fraction in the control, untreated cells, as described in the *Design and Methods* section. The apoptotic activity of bortezomib on CD34⁺ blast cells was similar to that observed in CD34⁻ blast cells (48±22% versus 57±27%, $p=0.86$), while doxorubicin was more effective on CD34⁻ cells, although differences were not statistically significant (33.8±26% versus 51.4±35%, $p=0.75$). Results are shown as mean±SD and statistical analyses were performed by paired samples Wilcoxon's rank test. p values are indicated. (B) The comparative effect of apoptosis induced by bortezomib (50 nM) and doxorubicin (1 µM) on CD34⁺ blast cells of paired samples from single patients. The percentage of apoptotic CD34⁺ blast cells is higher for bortezomib-treated cells than for doxorubicin-treated cells (mean±SD: 48±22% versus 31±26%, $p=0.002$). (C) Bortezomib is less toxic to normal residual lymphocytes. In 22 samples normal residual lymphocytes were identified and the percentage of apoptotic events induced by either bortezomib or doxorubicin was measured (18±12% versus 27±22%, $p=0.053$).

centrations, we observed that doxorubicin was slightly less cytotoxic on the total blast cell population (39±33% versus 48±22%, $p=0.30$ data not shown). More interesting was the difference between the two compounds' activities on CD34⁺ and CD34⁻ blast cell subsets. Bortezomib was significantly more active than doxorubicin in the immature CD34⁺ cells (48±22% versus 31±26%, $p=0.002$). (Figure 5A) In contrast, the activity of the two drugs on the CD34⁻ subset did not differ significantly (57±27% versus 47±35%, $p=0.17$). Considering paired samples from single cases, we observed that the effect of bortezomib on CD34⁺ cells was greater than that of doxorubicin, suggesting that bortezomib may overcome drug resistance associated with the immature phenotype (Figure 5B).

Bortezomib is less toxic than doxorubicin to normal residual lymphocytes

Within the same samples we analyzed the toxicity to residual normal lymphocytes. Our results demonstrate

that bortezomib is highly specific for leukemic cells, since the toxicity to residual normal lymphocytes was low (18±12%). Moreover, this toxicity was lower than that observed for doxorubicin (Figure 5C). Finally, we analyzed the toxicity of bortezomib against normal CD34⁺ cells from four normal bone marrow samples, and found that bortezomib is highly specific for CD34 leukemic cells, since toxicity to normal CD34⁺ cells was low (5±5.2%, data not shown).

Discussion

Nearly 80% of patients with AML achieve a complete remission with induction chemotherapy. However, a high proportion relapse, and eventually die of their disease.^{44,45} Recent studies have shown that proteasome inhibitors represent a valuable novel anticancer therapy. These agents inhibit the degradation of multiubiquitinated target proteins, i.e., cell cycle regu-

latory proteins such as cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors, and regulate cell cycle progression.⁴⁶ Bortezomib is the first proteasome inhibitor that has been introduced into clinical practice for the treatment of relapsed multiple myeloma,^{2,28,47,48} and active clinical investigation is ongoing in other malignancies.⁴⁹⁻⁵⁵ In this study we provide the framework for more intensive clinical investigation of bortezomib in AML. MTT uptake experiments on AML cell lines, sensitive and resistant to conventional chemotherapeutic agents, indicate that bortezomib is efficient at concentrations in the low nanomolar range, within pharmacologically achievable doses. Moreover, the *in vitro* activity of bortezomib appears to be clearly superior to that of conventional agents currently used for AML treatment such as doxorubicin, cytarabine and fludarabine. In addition, bortezomib showed a synergistic effect with doxorubicin and cytarabine against AML cells. This may be important since both conventional agents represent the backbone of AML treatment. Our studies on the mechanism of action of bortezomib indicate that this compound affects several pathways involved in the control of cell cycle progression and apoptosis. In HEL cells, bortezomib caused a progressive accumulation of cells in G₂/M with a decrease in the percentages of cells in G₀/G₁ and S phases. Induction of G₂/M arrest has previously been shown to occur in multiple myeloma,⁵⁶ non-small cell lung cancer,^{10,11} and ovarian cancer¹⁷ cells treated with bortezomib. Western blotting analyses indicated changes in the amounts of pRb, p27 and cyclin E. Furthermore, increased p27 levels have been reported in multiple myeloma cells⁶ as well as in ovarian cancer cells¹⁷ following treatment with bortezomib.

In addition to its effect on the cell cycle, bortezomib provoked cell death, as shown by annexin V positivity, loss of mitochondrial membrane potential, and DNA fragmentation. Analyses of the effect of bortezomib on AML cells indicated that this compound caused cleavage of the initiator caspases -8 and -9, effector caspase-3; and PARP. The cleavage of caspase-3 and PARP is consistent with results obtained in other types of tumor cells^{6,10,11,17} treated with comparable exposure to bortezomib. Moreover, pretreatment with Z-VAD-FMK blocked bortezomib-induced cell death suggesting that the caspase-dependent apoptotic pathway is the main executor of cell death caused by this compound. In line with our observations, Hideshima *et al.*⁴ also showed that caspase inhibitors were able to prevent bortezomib-induced apoptosis in multiple myeloma cells.

The progressive loss of mitochondrial membrane potential reflected an increase in the permeability of the outer mitochondrial membrane, which allowed release of pro-apoptotic proteins, such as AIF. The release of AIF is facilitated by decreased levels of Bcl-2 family members, which have been shown to regulate mitochondrial outer membrane permeability.^{43,57} Western blot analyses indicated that bortezomib

caused translocation of AIF from the mitochondrial to cytosolic fraction and down-regulated the antiapoptotic Bcl-2 family member Bcl-X. To the best of our knowledge, the contribution of AIF to bortezomib-induced cell death has not been previously reported. As AIF has been involved in caspase-independent cell death, our data both suggest a dual apoptotic mechanism induced by bortezomib in AML cells, involving both caspase-dependent and -independent pathways.

Finally, we had the opportunity to analyze the effect of bortezomib (compared to doxorubicin) on fresh cells obtained from a cohort of AML patients. As mentioned in the *Design and Methods* section, by using an appropriate triple antigen combination plus simultaneous staining with annexin V we were able to separate the blast cell population from the residual normal hematopoietic cells and to assess the proportion of apoptotic cells induced by the drug in each cell population. Moreover, even in cases with co-existence of CD34⁺ and CD34⁻ blast cells, our immunophenotypic approach clearly discriminated these two blast cell populations and enabled subsequent measurement of apoptosis induced in each subset. For this study, we used doxorubicin as a reference drug since it is a cornerstone of the treatment of AML. As observed in the cell lines, bortezomib showed greater antitumor activity than doxorubicin on patients' fresh blast cells, although the difference did not reach statistical significance. Interestingly, however, differences emerged when the CD34⁺ and CD34⁻ blast cell subsets were analyzed separately. Thus, while bortezomib had a similar pro-apoptotic effect on both cell populations, doxorubicin showed greater activity on the more mature cells (CD34⁻). Moreover, bortezomib was significantly more active than doxorubicin on immature CD34⁺ blast cells. This finding supports the belief that bortezomib could overcome the drug resistance associated with the immature phenotype.⁵⁴ Moreover, since the cell subset most commonly responsible for relapses is the CD34⁺ subset, bortezomib may represent an ideal drug for the eradication of minimal residual disease, which is currently the major therapeutic challenge in the treatment of AML. Finally, we observed that the antileukemic effect of bortezomib was selective, since the toxicity to normal residual lymphocytes was low. Similarly, proteasome inhibition specifically provoked apoptosis in CD34⁺/CD38⁻/CD123⁺ cells (leukemic stem cells) without significant toxicity to normal hematopoietic stem cells.^{58,59}

In summary our study indicates that bortezomib has marked *in vitro* activity in both AML cell lines and fresh blast cells obtained from patients. Moreover, the similar antileukemic effect of bortezomib on CD34⁺ and CD34⁻ AML cells suggests that this agent may overcome the drug resistance associated with the immature CD34⁺ phenotype. Collectively, these data open new pathways for the clinical development of bortezomib in the treatment of AML, and may add this already

approved drug to the therapeutic armamentarium against AML. For more than 30 years very few novel agents have been introduced to treat AML,⁶⁰ and yet many patients continue to relapse due to the persistence of residual resistant leukemic cells. Our data clearly support that further clinical investigation of bortezomib, particularly in combination with conventional agents, is warranted.

Authorship and Disclosures

EC: performed and designed the research, analyzed the data and wrote the paper; SÁ-F, JM-S, MG, EMO and JCM: performed research; PM: performed research and wrote the paper; MBV: designed the research, contributed analytical tools, and analyzed the data; AP and JFSM: designed the research and wrote the paper.

The authors reported no potential conflicts of interest.

References

- Mitsiades CS, Mitsiades N, Hideshima T, Richardson PG, Anderson KC. Proteasome inhibition as a new therapeutic principle in hematological malignancies. *Current Drug Targets* 2006;7:1341-7.
- Roccaro AM, Hideshima T, Richardson PG, Russo D, Ribatti D, Vacca A, et al. Bortezomib as an antitumor agent. *Current Pharm Biotechnol* 2006;7:441-8.
- Boccardo M, Morgan G, Cavenagh J. Preclinical evaluation of the proteasome inhibitor bortezomib in cancer therapy. *Cancer Cell Int* 2005;5:18.
- Hideshima T, Mitsiades C, Akiyama M, Hayashi T, Chauhan D, Richardson P, et al. Molecular mechanisms mediating antimyeloma activity of proteasome inhibitor PS-341. *Blood* 2003;101:1530-4.
- Ma MH, Yang HH, Parker K, Manyak S, Friedman JM, Altamirano C, et al. The proteasome inhibitor PS-341 markedly enhances sensitivity of multiple myeloma tumor cells to chemotherapeutic agents. *Clin Cancer Res* 2003;9:1136-44.
- Hideshima T, Richardson P, Chauhan D, Palombella VJ, Elliott PJ, Adams J, et al. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res* 2001;61:3071-6.
- LeBlanc R, Catley LP, Hideshima T, Lentzsch S, Mitsiades CS, Mitsiades N, et al. Proteasome inhibitor PS-341 inhibits human myeloma cell growth in vivo and prolongs survival in a murine model. *Cancer Res* 2002;62:4996-5000.
- Satou Y, Nosaka K, Koya Y, Yasunaga JI, Toyokuni S, Matsuoka M. Proteasome inhibitor, bortezomib, potently inhibits the growth of adult T-cell leukaemia cells both in vivo and in vitro. *Leukaemia* 2004; 18:1357-63.
- Amiri KI, Horton LW, LaFleur BJ, Sosman JA, Richmond A. Augmenting chemosensitivity of malignant melanoma tumors via proteasome inhibition: implication for bortezomib (VELCADE, PS-341) as a therapeutic agent for malignant melanoma. *Cancer Res* 2004;64:4912-8.
- Ling YH, Liebes L, Jiang JD, Holland JF, Elliott PJ, Adams J, et al. Mechanisms of proteasome inhibitor PS-341-induced G(2)-M-phase arrest and apoptosis in human non-small cell lung cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 2003;9:1145-54.
- Yang Y, Ikezoe T, Saito T, Kobayashi M, Koeffler HP, Taguchi H. Proteasome inhibitor PS-341 induces growth arrest and apoptosis of non-small cell lung cancer cells via the JNK/c-Jun/AP-1 signaling. *Cancer Sci* 2004;95:176-80.
- Codony-Servat J, Tapia MA, Bosch M, Oliva C, Domingo-Domenech J, Mellado B, et al. Differential cellular and molecular effects of bortezomib, a proteasome inhibitor, in human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2006;5:665-75.
- Shah SA, Potter MW, McDade TP, Ricciardi R, Perugini RA, Elliott PJ, et al. 26S proteasome inhibition induces apoptosis and limits growth of human pancreatic cancer. *J Cell Biochem* 2001;82:110-22.
- Nawrocki ST, Bruns CJ, Harbison MT, Bold RJ, Gotsch BS, Abbruzzese JL, et al. Effects of the proteasome inhibitor PS-341 on apoptosis and angiogenesis in orthotopic human pancreatic tumor xenografts. *Mol Cancer Ther* 2002;1:1243-53.
- Williams S, Pettaway C, Song R, Papandreou C, Logothetis C, McConkey DJ. Differential effects of the proteasome inhibitor bortezomib on apoptosis and angiogenesis in human prostate tumor xenografts. *Mol Cancer Ther* 2003;2:835-43.
- Williams SA, McConkey DJ. The proteasome inhibitor bortezomib stabilizes a novel active form of p53 in human LNCaP-Pro5 prostate cancer cells. *Cancer Res* 2003; 63:7338-44.
- Bazzaro M, Lee MK, Zoso A, Stirling WL, Santillan A, Shih IeM, et al. Ubiquitin-proteasome system stress sensitizes ovarian cancer to proteasome inhibitor-induced apoptosis. *Cancer Res* 2006;66:3754-63.
- Fribley A, Zeng Q, Wang C-Y. Proteasome inhibitor PS-341 induces apoptosis through induction of endoplasmic reticulum stress-reactive oxygen species in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Mol Cell Biol* 2004;24:9695-704.
- Coquelle A, Mouhamad S, Pequignot MO, Braun T, Carvalho G, Vivet S, et al. Cell cycle-dependent cytotoxic and cytostatic effects of bortezomib on colon carcinoma cells. *Cell Death Differ* 2006;13:873-5.
- Jones DR, Broad RM, Madrid LV, Baldwin AS, Mayo MW. Inhibition of NF-[k]B sensitizes non-small cell lung cancer cells to chemotherapy-induced apoptosis. *Ann Thorac Surg* 2000;70:930-6.
- Bold RJ, Virudachalam S, McConkey DJ. Chemosensitization of pancreatic cancer by inhibition of the 26S proteasome. *J Surg Res* 2001;100:11-7.
- Fahy BN, Schlieman MG, Virudachalam S, Bold RJ. Schedule-dependent molecular effects of the proteasome inhibitor bortezomib and gemcitabine in pancreatic cancer. *J Surg Res* 2003;113:88-95.
- Mitsiades N, Mitsiades CS, Richardson PG, Poulaki V, Tai YT, Chauhan D, et al. The proteasome inhibitor PS-341 potentiates sensitivity of multiple myeloma cells to conventional chemotherapeutic agents: therapeutic applications. *Blood* 2003; 101: 2377-80.
- Denlinger CE, Rundall BK, Keller MD, Jones DR. Proteasome inhibition sensitizes non-small-cell lung cancer to gemcitabine-induced apoptosis. *Ann Thorac Surg* 2004; 78: 1207-14.
- Denlinger CE, Rundall BK, Jones DR. Proteasome inhibition sensitizes non-small cell lung cancer to histone deacetylase inhibitor-induced apoptosis through the generation of reactive oxygen species. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004;128:740-8.
- Mateos MV, Hernández JM, Hernández MT, Gutiérrez NC, Palomera L, Fuertes M, et al. Bortezomib plus melphalan and prednisone in elderly untreated patients with multiple myeloma: results of a multicenter phase 1/2 study. *Blood* 2006; 108:2165-72.
- Richardson PG, Sonneveld P, Schuster MW, Irwin D, Stadtmauer EA, Facon T, et al. Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma. Assessment of Proteasome Inhibition for Extending Remissions (APEX) Investigators. *N Engl J Med* 2005;352:2487-98.
- Kane RC, Farrell AT, Sridhara R, Pazdur R. United States Food and Drug Administration approval summary: bortezomib for the treatment of progressive multiple myeloma after one prior therapy. *Clin Cancer Res* 2006; 12:2955-60.

29. Cortes J, Thomas D, Koller C, Giles F, Estey E, Faderl S, et al. Phase I study of bortezomib in refractory or relapsed acute leukemias. *Clin Cancer Res* 2004;10:3371-6.
30. Orłowski RZ, Voorhees PM, Garcia RA, Hall MD, Kudrik FJ, Allred T, et al. Phase 1 trial of the proteasome inhibitor bortezomib and pegylated liposomal doxorubicin in patients with advanced hematologic malignancies. *Blood* 2005;105:3058-65.
31. Attar EC, De Angelo DJ, Sirulnik A. Addition of Bortezomib (Velcade) to AML induction chemotherapy is well tolerated and results in a high complete remission rate. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2005; 106:2782.
32. Myint H, NP L. The prognostic significance of the CD34 antigen in acute myeloid leukaemia. *Leuk Lymphoma* 1992;7:425-9.
33. Geller RB, Zahurak M, Hurwitz CA, Burke PJ, Karp JE, Piantadosi S, et al. Prognostic importance of immunophenotyping in adults with acute myelocytic leukaemia: the significance of the stem-cell glycoprotein CD34 (My10). *Br J Haematol* 1990; 76:340-7.
34. Suarez L, Vidriales MB, Moreno MJ, López A, García-Laraña J, Pérez-López C, et al. Differences in anti-apoptotic and multidrug resistance phenotypes in elderly and young acute myeloid leukemia patients are related to the maturation of blast cells. *PETHEMA Cooperative Group. Haematologica* 2005; 90:54-9.
35. Repp R, Schaeckel U, Helm G, Thiede C, Soucek S, Pascheberg U, et al. Immunophenotyping is an independent factor for risk stratification in AML. *AML-SHG Study Group. Cytometry B Clin Cytom* 2003;53:11-9.
36. Baer MR, Stewart CC, Dodge RK, Leget G, Sulé N, Mrózek K, et al. High frequency of immunophenotype changes in acute myeloid leukemia at relapse: implications for residual disease detection (Cancer and Leukemia Group B Study 8361). *Blood* 2001;97:3574-80.
37. Macedo A, San Miguel JF, Vidriales MB, López-Berges MC, García-Marcos MA, Gonzalez M, et al. Phenotypic changes in acute myeloid leukaemia: implications in the detection of minimal residual disease. *J Clin Pathol* 1996;49:15-8.
38. Schoch C, Kern W, Schnittger S, Büchner T, Hiddemann W, Haferlach T. The influence of age on prognosis of de novo acute myeloid leukemia differs according to cytogenetic subgroups. *Haematologica* 2004; 89:1082-90.
39. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.
40. Carvajal-Vergara X, Tabera S, Montero JC, Esparis-Ogando A, López-Pérez R, Mateo G, et al. Multifunctional role of Erk5 in multiple myeloma. *Blood* 2005;105: 4492-9.
41. Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* 1984;22:27-55.
42. Ramirez JM, Ocio EM, San Miguel JF, Pandiella A. Gemtrexed acts as an antimyeloma agent by provoking cell cycle blockade and apoptosis. *Leukemia* 2007;21:797-804.
43. Kroemer G, Martin SJ. Caspase-independent cell death. *Nat Med* 2005;11:725-30.
44. Estey E, Dohner H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet* 2006;368:1894-907.
45. Jabbour EJ, Estey EJ, Kantarjian HM. Adult acute myeloid leukemia. *Mayo Clin Proc* 2006;81:247-60.
46. King RW, Deshaies RJ, Peters JM, Kirschner MW. How proteolysis drives the cell cycle. *Science* 1996; 274:1652-9.
47. San Miguel J, Blade J, Boccadoro M, Cavenagh J, Glasmacher A, Jagannath S, et al. A practical update on the use of bortezomib in the management of multiple myeloma. *Oncologist* 2006;11:51-61.
48. Richardson PG, Barlogie B, Berenson J, Singhal S, Jagannath S, Irwin D, et al. A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *N Engl J Med* 2003; 348:2609-17.
49. Ryan DP, Appleman LJ, Lynch T, Supko JG, Fidas P, Clark JW, et al. Phase I clinical trial of bortezomib in combination with gemcitabine in patients with advanced solid tumors. *Cancer* 2006;107:2482-9.
50. Papandreou CN, Daliani DD, Nix D, Yang H, Madden T, Wang X, et al. Phase I trial of the proteasome inhibitor bortezomib in patients with advanced solid tumors with observations in androgen-independent prostate cancer. *J Clin Oncol* 2004;22:2108-21.
51. Davis NB, Taber DA, Ansari RH, Ryan CW, George C, Vokes EE, et al. Phase II trial of PS-341 in patients with renal cell cancer: a University of Chicago phase II consortium study. *J Clin Oncol* 2004;22:115-9.
52. Kondagunta GV, Drucker B, Schwartz L, Bacik J, Marion S, Russo P, et al. Phase II trial of bortezomib for patients with advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2004; 22: 3720-5.
53. Shah MH, Young D, Kindler HL, Webb I, Kleiber B, Wright J, et al. Phase II study of the proteasome inhibitor bortezomib (PS-341) in patients with metastatic neuroendocrine tumors. *Clin Cancer Res* 2004; 10:6111-8.
54. Maki RG, Kraft AS, Scheu K, Yamada J, Wadler S, Antonescu CR, et al. A multicenter Phase II study of bortezomib in recurrent or metastatic sarcomas. *Cancer* 2005; 103: 1431-8.
55. Ryan DP, O'Neil BH, Supko JG, Rocha Lima CM, Dees EC, Appleman LJ, et al. A phase I study of bortezomib plus irinotecan in patients with advanced solid tumors. *Cancer* 2006;107:2688-97.
56. Buzzeo R, Enkemann S, Nimmanapalli R, Alsina M, Lichtenheld MG, Dalton WS, et al. Characterization of a R115777-resistant human multiple myeloma cell line with cross-resistance to PS-341. *Clin Cancer Res* 2005;11:6057-64.
57. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 2004;116:205-19.
58. Guzman ML, Neering SJ, Upchurch D, Grimes B, Howard DS, Rizzieri DA, et al. Nuclear factor- κ B is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells. *Blood* 2001;98:2301-7.
59. Guzman ML, Swiderski CE, Howard DS, Grimes BA, Rossi RM, Szilvassy SJ, et al. Preferential induction of apoptosis for primary human leukemic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:16220-5.
60. Tallman MS, Gilliland DG, Rowe JM. Drug therapy for acute myeloid leukemia. *Blood* 2005;106:1154-63.

CAPÍTULO 2: Panobinostat y Doxorrubicina en LAM

La deregulación epigenética es un fenómeno clave dentro de la patogénia de las leucemias mieloblásticas, lo que resulta en la transcripción aberrante de genes implicados en el la proliferación, diferenciación y muerte celular.⁵¹⁰ La acetilación de histonas es un mecanismo de regulación epigenética que está mediado por la actividad de las Histona Acetil Transferasas (HATs) y las Histona DeAcetiladas (HDACs).^{458, 511} El delicado equilibrio presente en las células normales,⁵¹² se ve roto en las LAM debido a distintos mecanismos.^{458, 511, 513} Panobinostat (LBH589) es un nuevo inhibidor pan-acetilasa de la clase de compuestos de CAH (Cinnamic acid hydroxamate) que ha demostrado actividad en modelos preclínicos de distintas neoplasias y se encuentra en fase de investigación clínica.^{463,514,515}

En este capítulo se presenta la evaluación de los efectos de Panobinostat en monoterapia y en combinación con agentes convencionales en el tratamiento de la LAM. Panobinostat presenta un alto efecto antileucémico, tanto en líneas celulares como en muestras obtenidas de pacientes en el momento del diagnóstico de la LAM, incluso a concentraciones menores que fármacos convencionales como doxorubicina, citarabina y fludarabina, con una IC₅₀ en el rango nanomolar bajo, mientras que no se observa un efecto tóxico sobre los linfocitos residuales de la muestra. Más importante, Panobinostat presenta un claro efecto sinérgico con citarabina y, especialmente, con doxorubicina. Debido este potente efecto sinérgico, se decidió explorar en profundidad el mecanismo de acción de Panobinostat y doxorubicina. La combinación afecta a varias rutas implicadas en el control de la progresión en ciclo celular, además de rutas implicadas en apoptosis y en reparación de daño al ADN. A nivel de expresión

génica, un gran número de genes (588) aparecieron deregulados solamente en la combinación de Panobinostat y doxorubicina, sin estar afectados por ninguno de los dos fármacos de forma independiente, lo que implica que esta desregulación genómica no es debida al efecto individual de Panobinostat y doxorubicina, si no a mecanismos singulares generados por el sinergismo entre ambos fármacos. La combinación de panobinostat y doxorubicina provoca muerte celular mediante un aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa, lo que se acompaña de aumento de las proteínas pro-apoptóticas de la familia de Bax, junto con apoptosis dependiente de caspasas. La importancia de la activación de caspasas fue evaluada con el uso de un inhibidor (Z-VAD-FMK) que fue capaz de evitar la muerte dependiente de caspasas. Además de los efectos anteriormente descritos, la combinación de Panobinostat y Doxorubicina provoca un daño directo al ADN, posiblemente secundario a roturas de doble hebra.

En resumen, Panobinostat presenta un potente efecto antileucémico, que es sinérgico con fármacos clásicamente usados en el tratamiento de las LAM. El mecanismo de acción de su combinación con doxorubicina es múltiple, implicando deregulación del ciclo celular, daño al ADN e inducción de vías apoptóticas dependientes e independientes de caspasas. El papel real del Panobinostat en el tratamiento de las LAM, dado su favorable perfil preclínico, deberá de ser confirmado en ensayos clínicos.

ORIGINAL ARTICLE

The synergy of panobinostat plus doxorubicin in acute myeloid leukemia suggests a role for HDAC inhibitors in the control of DNA repair

P Maiso¹, E Colado², EM Ocio^{1,2}, M Garayoa¹, J Martín², P Atadja³, A Pandiella¹ and JF San-Miguel^{1,2}

¹Department of Hematology, Centro de Investigación del Cáncer, Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer/Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain; ²Department of Hematology, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain and ³Novartis Oncology, Novartis Institutes for Biomedical Research, Cambridge, MA, USA

Acute myeloid leukemia (AML) is a clonal disorder characterized by the accumulation of myeloid blasts in the bone marrow. Here, we report the effects of the novel histone deacetylase inhibitor panobinostat (LBH589) in combination with doxorubicin on AML cells. Panobinostat exhibited potent anti-AML activity in all AML cell lines tested and in primary AML cells from patients (IC₅₀ < 20 nM). In addition, panobinostat potentiated the action of several standard-of-care anti-AML compounds, particularly, doxorubicin. The molecular effects induced by panobinostat and doxorubicin treatment were investigated by analyzing gene expression, cell cycle, apoptosis and signaling pathways. Analyses of gene expression profiles identified 588 genes whose expression was exclusively affected by the combination of panobinostat and doxorubicin. The combination induced AML cell death by an increase in the mitochondrial outer membrane permeability and release of cytochrome *c* from the mitochondria, resulting in caspase-dependent apoptosis and accompanied by the upregulation of Bax, Bak and, particularly, Bad. The drug combination provoked a strong activation of a DNA damage response, indicating that this combination may trigger cell death by a mechanism that induced DNA double-strand breaks. These data indicate that the combination of panobinostat and doxorubicin may be an effective therapy for the treatment of AML.

Leukemia advance online publication, 8 October 2009; doi:10.1038/leu.2009.182

Keywords: panobinostat; LBH589; acute myeloid leukemia; HDAC inhibitor; apoptosis; doxorubicin

Introduction

Acute myeloid leukemia (AML) is a heterogeneous, clonal disorder of hematopoietic progenitor cells that lose the ability to normally differentiate and to respond to regulators of proliferation.¹ Although important advances have been made in the knowledge of the pathophysiologic bases of this disease, the treatment of AML has remained largely unchanged for more than 30 years.^{2,3} Thus the identification of novel drugs for the treatment of AML is a significant unmet need, as 20–40% of patients do not respond to initial chemotherapy, and approximately 50% of responding patients will eventually relapse.^{1,2}

Epigenetic deregulation is a key feature in the pathophysiology of AML, resulting in aberrant transcription of genes involved in cell growth, proliferation, differentiation and

apoptosis.⁴ Histone acetylation is a major epigenetic mechanism for the regulation of gene expression and is maintained by the activities of histone deacetylases (HDACs) and histone acetyltransferases (HATs). Rather, in normal cells, there is a balance between the activities of HDACs and HATs.^{5,6} In leukemic cells, this balance is disrupted by mechanisms that include chromosomal translocations, which promote oncogenesis by recruitment of HDAC activities, as well as aberrant expression of HDAC or HAT enzymes.^{7,8} These events lead to altered levels and patterns of histone acetylation and deacetylation that alter normal gene expression.^{7,8} A prominent example of an HDAC-associated translocation in leukemogenesis is the t(8;21) that results in the fusion protein AML1-ETO. AML1-ETO combines the DNA-binding activities of a critical regulator of hematopoiesis with the HDAC-recruiting capabilities of a co-repressor to generate dominant-negative inhibitors of AML1-responsive promoters, resulting in the silencing of genes involved in myeloid differentiation.⁷

Given the epigenetic deregulation observed in AML pathogenesis, agents such as histone deacetylase inhibitors (HDACi) and DNA methyltransferase inhibitors are in clinical development for AML treatment. HDACi have not only been classically proposed to restore the balance of histone acetylation and regulation of gene expression but also to target many other non-histone HDAC substrates involved in the regulation of multiple cellular functions, including cell cycle, cell proliferation and cell death. In transformed cells, HDACi have been shown to induce growth arrest, activation of the extrinsic and/or intrinsic apoptotic pathways, autophagic cell death, reactive-oxygen-species-induced cell death, mitotic cell death and senescence.^{9,10} HDACi have shown particular efficacy in hematologic malignancies, and the hydroxamic acid (vorinostat, SAHA) is the first to be approved by the US Food and Drug Administration for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma. Vorinostat and other HDACi have been already tested in phase I/II trials in patients with refractory acute leukemias.¹¹

Attempts to improve HDACi potency led to the development of a novel class of cinnamic acid hydroxamate compounds, being panobinostat (LBH589), a prominent example of this group of agents. Panobinostat has shown strong preclinical activity in several preclinical cancer models,^{12–14} and is currently in clinical trials for a number of hematologic malignancies, including lymphomas, leukemias and myelodysplastic syndromes.

In the present study, we have investigated the *in vitro* anti-AML activities of panobinostat alone and in combination with other agents. Our results demonstrate that panobinostat has potent activity against AML cell lines and primary AML cells from patients. Owing to the large body of evidence indicating

Correspondence: Dr P Maiso, Department of Hematology, Cancer Research Center, University of Salamanca, Avda. Universidad de Coimbra, s/n. 37007 Salamanca, Spain.

E-mail: p_maiso@hotmail.com

Received 17 March 2009; revised 20 July 2009; accepted 29 July 2009

that combination treatments often result in an increased efficacy in AML, we investigated potential synergy of panobinostat with well-established anti-AML agents that are currently in the clinic. A significant level of synergy in combination with doxorubicin was observed. Moreover, the combination of panobinostat and doxorubicin was found to affect the expression of a significant number of genes, which were unaffected by either of the two compounds as single agents. These data have been the bases for a clinical trial that will test this combination in refractory AML patients.

Materials and methods

Reagents and immunochemicals

Cell culture media, serum and penicillin–streptomycin were from Invitrogen Corporation (Gaithersburg, MD, USA). Panobinostat was provided by Novartis Pharmaceuticals (East Hannover, NJ, USA). Doxorubicin, daunorubicin, cytarabine (Ara-C) and fludarabine were purchased from Sigma Chemical (Madrid, Spain). Bortezomib was obtained from Millennium Pharmaceuticals (Cambridge, MA, USA). Annexin V–FITC was obtained from BD Biosciences (San Diego, CA, USA). Z-VAD-FMK, Z-IETD-FMK, Z-LEHD-FMK, SB203580 and SP600125 were from Calbiochem (San Diego, CA, USA). Other generic chemicals were purchased from Sigma Chemical, Roche Biochemicals (Mannheim, Germany) or Merck (Darmstadt, Germany).

The origins of the different monoclonal antibodies used in the western blotting analyses were as follows: anti-Bcl-2, anti-Mcl-1 and anti-Bak were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA); anti-p-Histone H4, anti-p-H2AX, anti-p53, anti-Bcl-X, anti-Bad, anti-Bax, anti-PARP, anti-caspase-3, anti-caspase-7, anti-caspase-8, anti-caspase-9, anti-p-p38, anti-p38, anti-pATM, anti-pCHK1, anti-pCHK2, anti-RAD51 and anti-RAD54B were from Cell Signaling (Boston, MA, USA); the anti-cytochrome *c* was from BD Biosciences. The horseradish-peroxidase-conjugated secondary antibodies were from Amersham (Buckinghamshire, UK).

Cell culture

All AML cell lines (HEL, HL60, KG-1 and MV4-11) were cultured at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂–95% air. HL60 was derived from a French–American–British (FAB) M2 AML patient; HEL derived from an FAB M6 AML patient and carried an activating mutation of JAK2; MV4-11 was derived from an FAB M4 AML patient and carried a mixed-lineage leukemia rearrangement and an FLT3-internal tandem duplication (ITD); KG-1 was derived from a patient diagnosed of a blastic crisis of an MPD and carried a rearrangement of FGFR1. Cell lines and cells obtained from AML patients were cultured in RPMI 1640 medium with L-glutamine and supplemented with antibiotics (penicillin at 100 U/ml, streptomycin at 100 µg/ml) and 10% fetal bovine serum (FBS) for cell lines or 20% FBS for patient cells. The source of the AML cell lines was described previously.¹⁵

Cell proliferation, cell cycle and apoptosis assays

The proliferation of AML cells was examined using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) colorimetric assays, as described.¹³ For cytometric evaluation of apoptosis in AML cell lines, we washed 1 × 10⁶ HEL cells with phosphate-buffered saline (PBS) and resuspended in binding buffer (10 mM HEPES/NaOH (pH 7.4), 140 mM NaCl,

2.5 mM CaCl₂). Cells were incubated with 5 µl of Annexin V–FITC for 10 min in the dark at room temperature, followed by addition of 10 µl propidium iodide (PI; Calbiochem).

To qualitatively evaluate the mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$), we incubated cells in PBS with 20 nM 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide (DiOC₆(3); Molecular Probes, Leiden, the Netherlands) for 20 min at 37 °C and washed with PBS, followed by addition of 10 µl PI (Calbiochem) and fluorescence-activated cell sorting analysis.¹³

Evaluation of the potential synergism of panobinostat with other compounds

HEL cells were treated for 24 and 48 h with increasing doses of panobinostat and doxorubicin as indicated. Cell viability was analyzed by MTT assay. The potency of the combination was quantified with the Calcsyn software (Biosoft, Ferguson, MO, USA), which is based on the Chou–Talalay method¹⁶ that calculates a combination index (CI) with the following interpretation: CI > 1, antagonistic effect; CI = 1, additivity; CI < 1, synergistic effect.

Ex vivo experiments in freshly isolated AML cells

The cytometric analyses of apoptosis have been described elsewhere.¹⁵ Briefly, bone marrow (BM) cells were obtained from six AML patients at diagnosis before any treatment, 1 × 10⁶ BM cells were incubated in six-well plates with panobinostat (10 nM), doxorubicin (500 nM), both, or without any drug (control) for 18 h at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂–95% air. The drug concentrations were selected based on the median plasma levels achieved in patients for these drugs and our own results of cell lines. Using quadruple staining (Annexin V–FITC/CD33–PE/CD45–PerCP/CD34–APC), we were able to identify and distinguish the blast cell population (CD34–/+, CD33–/+, CD45dim) from the normal residual lymphocytes (CD45+, SSClo) and quantify the number of apoptotic cells in each cell population. The percentage of apoptotic events was adjusted according to the proportion of apoptotic cells in the control group. Statistical significance between the combination and each drug in monotherapy was analyzed by using the Mann–Whitney *U*-test.

Microarray RNA analyses

HEL cells were treated with panobinostat (10 nM) or doxorubicin (500 nM) for 24 h and with the combination for 12 h. Total RNA was extracted using Trizol reagent from Life Technologies, (Rockville, MD, USA) and purified with RNeasy Mini kit from Qiagen (Valencia, CA, USA). RNA integrity was verified with the Agilent 2100 Bioanalyzer from Agilent (Santa Clara, CA, USA). Double-stranded cDNA and biotinylated cRNA were synthesized with T7-polyT primer and the BioArray RNA labeling kit from Enzo (New York, NY, USA), respectively. Labeled RNA was fragmented and hybridized to Affymetrix HG-U133 Plus 2.0 GeneChip oligonucleotide arrays from Affymetrix (Santa Clara, CA, USA), which were scanned in a GeneArray scanner and analyzed using the DNA-Chip Analyzer software from DChip (Boston, MA, USA). Changes in expression greater than twofold were considered significant.

Western blotting

Cells were collected and centrifuged at 10 000 g for 2 min. Cells were washed with PBS and lysed in ice-cold lysis buffer (140 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10% glycerol, 1% Nonidet P-40, 20 mM

Tris (pH 7.0), 1 μ M pepstatin, 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin, 1 mM sodium orthovanadate). Western blotting analyses were performed as described previously.¹³

Subcellular fractionation

HEL cells were harvested in isotonic mitochondrial buffer¹³ (250 mM sucrose, 20 mM HEPES, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 μ M pepstatin, 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin, 1 mM sodium orthovanadate) and Dounce homogenized by 60–70 strokes. Samples were transferred to Eppendorf tubes and centrifuged at 770g for 10 min at 4 °C to separate nuclei and unbroken cells. The resulting supernatant was centrifuged at 10 000g for 25 min at 4 °C to obtain the mitochondrial pellet. The supernatant was further centrifuged at 100 000g for 1 h at 4 °C to yield the final soluble cytosolic fraction.

Results

Panobinostat induces histone acetylation in AML cells

To verify whether panobinostat induces hyperacetylation of histones in AML, we treated HEL cells with different concentrations for 24 h and with panobinostat (100 nM) for different times, and acetylation of histone H4 was analyzed by western blotting. HEL cells exhibited a progressive increase in histone H4 acetylation correlating with panobinostat dose (Figure 1a) and length of treatment (Figure 1b).

Action of panobinostat in AML cells

We assessed the biologic effect of panobinostat on AML cells by using MTT assays on four different representative AML cell lines: HEL, HL60, KG1 and MV4-11. Treatment with increasing doses of panobinostat (1–1000 nM) for 48 h suppressed MTT metabolization, indicating potent inhibition of cell proliferation and viability (Figure 1c). IC₅₀ values for panobinostat in these cell lines were 9 nM (HEL), 7 nM (HL60), 17 nM (KG1) and 6 nM

(MV4-11). Comparison of these IC₅₀ values for panobinostat with those of other compounds commonly used in AML treatment indicated that panobinostat was more potent than Ara-C, fludarabine, doxorubicin and bortezomib (IC₅₀ = 740, 362, 220 and 14 nM, respectively, for HEL cells; data not shown).

Synergy of panobinostat with doxorubicin in AML

To investigate whether panobinostat could potentiate the activity of other anti-AML agents, we treated HEL cells with combinations of panobinostat and four other compounds; Ara-C, fludarabine, doxorubicin and bortezomib (Figure 2a). As shown in Figure 2a, the combination of panobinostat with Ara-C, fludarabine or bortezomib was found to further decrease AML cell viability, compared with single-agent treatment. However, especially significant effects were observed in combination with doxorubicin. This potentiation was also explored using daunorubicin, another anthracycline which is commonly used in the treatment of AML, displaying similar results as those shown with doxorubicin (Supplementary data). To verify whether panobinostat was able to increase the effect of doxorubicin in other AML cell lines (including cell lines partially resistant to doxorubicin), we tested the effect of the combination on the viability of HEL, HL60, KG1 and MV4-11 cell lines for treatment periods of 24 and 48 h. As shown in Figure 2b, the combination of panobinostat and doxorubicin resulted in significant growth inhibition of all cell lines tested, compared to that seen with single-agent treatment. The CI values for the combination consistently indicated significant synergy, as defined by CI < 1, ranging from 0.05 to 0.53 in HEL; 0.11 to 0.26 in HL60; 0.04 to 0.09 in KG1 and 0.21 to 1.66 in MV4-11 after 24 h (Table 1). In the MV4-11 cell line, the CI range value decreased up to 0.17–0.41 after 48 h of treatment (data not shown). The effects of sequential drug treatment were also explored, showing similar results when panobinostat and doxorubicin were administered sequentially, rather than simultaneously (data not shown).

The effects of panobinostat with doxorubicin on primary leukemic cells were assessed on cells from six AML patients. As

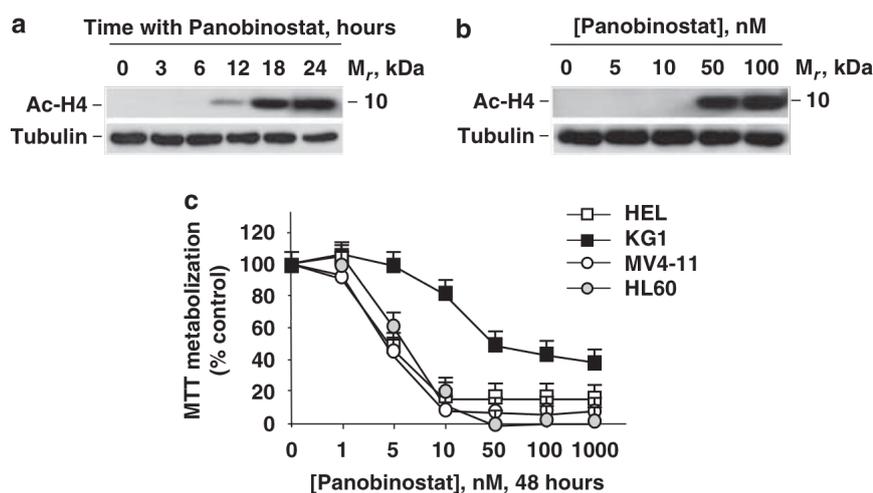
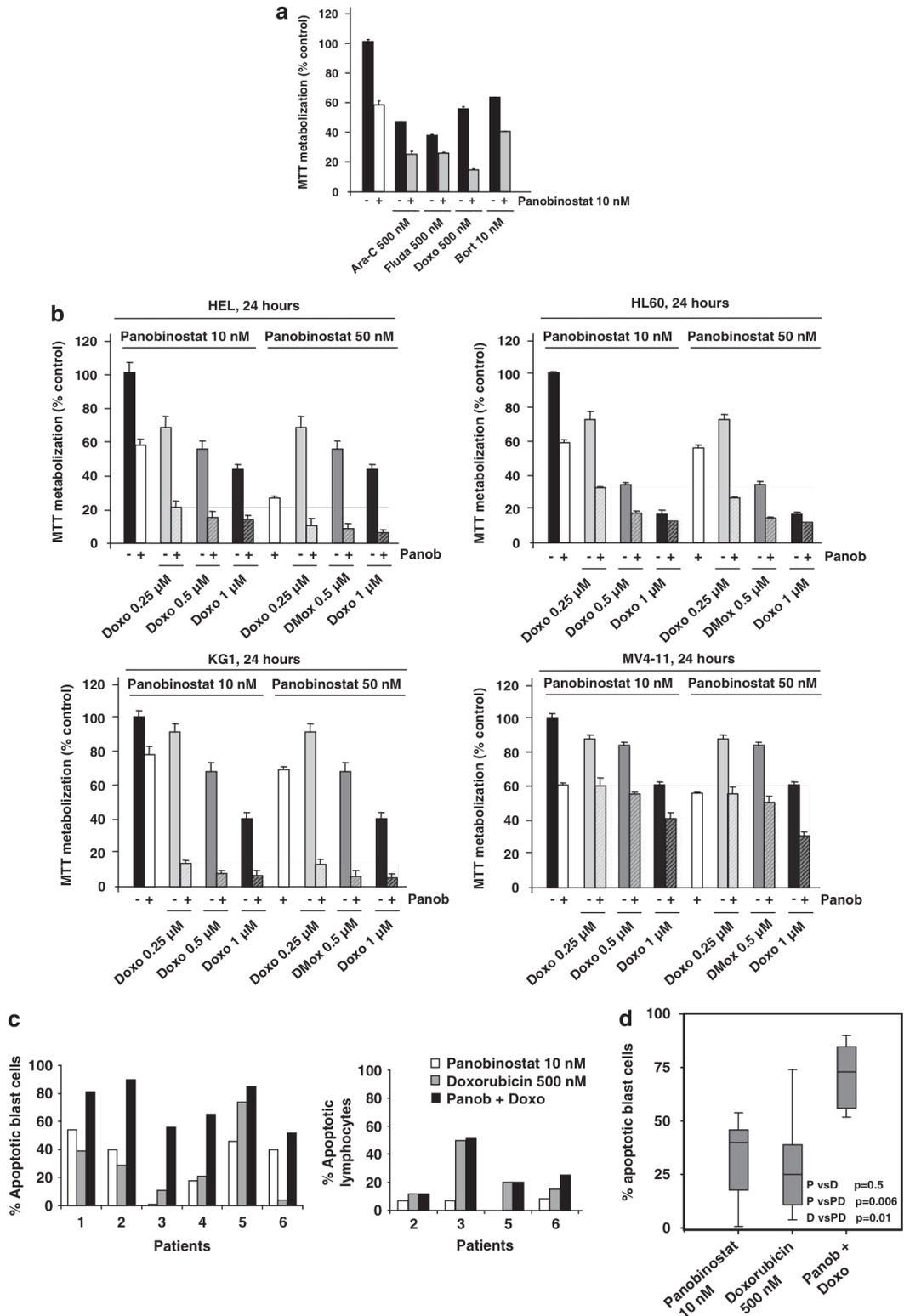


Figure 1 Effect of panobinostat on acetylation of histone H4 in acute myeloid leukemia (AML) cells and on the proliferation of AML cells. (a) Effects of panobinostat on histone H4 acetylation in AML cells. HEL cells were treated for the indicated times with panobinostat (100 nM), and doses for 24 h with panobinostat (b), and acetylation of histone H4 was detected by western blotting with anti-acetyl-histone H4 antibody. Anti-tubulin detection is shown as a loading control. (c) Dose effect of panobinostat on HEL, HL60, KG1 and MV4-11 cells. Cells were plated at identical densities in 48-well dishes; panobinostat was added at the indicated concentrations. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) uptake assays were performed at 48 h as described in Materials and methods. The percentages of viable cells after treatment are compared to untreated cells (dose 0), which is considered the control experiment.

illustrated in Figure 2c, the combination of 10 nM panobinostat and 500 nM doxorubicin significantly increased the number of apoptotic blasts, as measured by Annexin V staining, indicating increased antileukemic activity compared to the single-agent compounds. Interestingly, all samples were sensitive to the combination, despite the heterogeneity of their biologic features: patient 1 had a relapsed FAB M5 AML; patients 2, 3

and 5 were newly diagnosed patients with FAB M1 AML whereas patient 6 was an M2 AML; patient 4 was a blast crisis of a chronic myelomonocytic leukemia. Cytogenetic and fluorescence *in situ* hybridization studies were performed in four of the samples without any abnormality in any of the patients. Regarding mutational status, it was performed in three patients: patient 1 did not show FLT3-ITD or mutation of NPM-1; patient



5 displayed both abnormalities and patient 6 was FLT3-ITD negative with mutated NPM-1. Notably, there was no increase in the levels of apoptosis in normal residual lymphocytes, suggesting cancer-cell-specific cytotoxicity of the combination.

A conjunct analysis of the activity of panobinostat and doxorubicin in the blast population of the six patients shows statistically significant superiority for the combination as compared to the drugs in monotherapy (Figure 2d).

Table 1 Summary of CIs generated from the isobologram of increasing concentrations of panobinostat and doxorubicin for HEL, HL60, KG1 and MV4-11 cell lines

Combination	LBH589 (nM)	FA _{LBH589}	Doxorubicin (nM)	FA _{Doxo}	FA _{Comb}	CI
<i>HEL (24 h)</i>						
1	5	0.1534	0.25	0.3233	0.4730	0.533
2	5	0.1534	0.5	0.4468	0.7249	0.114
3	5	0.1534	1	0.5672	0.8378	0.051
4	10	0.4259	0.25	0.3233	0.7923	0.131
5	10	0.4259	0.5	0.4468	0.8528	0.082
6	10	0.4259	1	0.5672	0.8621	0.077
7	50	0.7360	0.25	0.3233	0.8965	0.260
8	50	0.7360	0.5	0.4468	0.9158	0.202
9	50	0.7360	1	0.5672	0.9417	0.131
<i>HL60 (24 h)</i>						
1	5	0.3318	0.25	0.2743	0.6479	0.268
2	5	0.3318	0.5	0.6552	0.8509	0.122
3	5	0.3318	1	0.8299	0.8555	0.232
4	10	0.4091	0.25	0.2743	0.6759	0.232
5	10	0.4091	0.5	0.6552	0.8249	0.156
6	10	0.4091	1	0.8299	0.8725	0.193
7	50	0.4416	0.25	0.2743	0.7345	0.176
8	50	0.4416	0.5	0.6552	0.8585	0.114
9	50	0.4416	1	0.8299	0.8786	0.180
<i>KG1 (24 h)</i>						
1	5	0.0549	0.25	0.0889	0.7373	0.094
2	5	0.0549	0.5	0.3209	0.9202	0.046
3	5	0.0549	1	0.5977	0.9285	0.08
4	10	0.2186	0.25	0.0889	0.8628	0.05
5	10	0.2186	0.5	0.3209	0.9235	0.047
6	10	0.2186	1	0.5977	0.9321	0.079
7	50	0.3126	0.25	0.0889	0.8653	0.099
8	50	0.3126	0.5	0.3209	0.9393	0.055
9	50	0.3126	1	0.5977	0.9443	0.081
<i>MV411 (24 h)</i>						
1	5	0.2226	0.25	0.1252	0.2408	1.114
2	5	0.2226	0.5	0.1576	0.3117	0.794
3	5	0.2226	1	0.3959	0.4946	0.307
4	10	0.3959	0.25	0.1252	0.4014	0.531
5	10	0.3959	0.5	0.1576	0.4487	0.449
6	10	0.3959	1	0.3959	0.5937	0.213
7	50	0.4416	0.25	0.1252	0.4476	1.666
8	50	0.4416	0.5	0.1576	0.4974	1.239
9	50	0.4416	1	0.3959	0.6914	0.337

CI less than 1.0 indicates synergistic effect, CI equal to 1.0 indicates additive effect and CI greater than 1.0 indicates antagonism. FA_{panobinostat} indicates fraction of growth inhibition by panobinostat alone; FA_{Doxo}, fraction of growth inhibition by doxorubicin alone and FA_{Comb}, fraction of growth inhibition by panobinostat plus doxorubicin.

Figure 2 Synergistic effect of panobinostat and doxorubicin in acute myeloid leukemia (AML) cells. (a) HEL cells were treated with single-agent Ara-C (500 nM), fludarabine (500 nM), doxorubicin (500 nM) and bortezomib (10 nM) in the presence or absence of panobinostat (10 nM) for 48 h and analyzed by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assays. The average proliferation values of control untreated samples were taken as 100%. Data are represented as the mean ± s.d. of quadruplicates of an experiment that was repeated at least thrice. (b) Panobinostat (10 and 50 nM) was combined with doxorubicin (0.25, 0.5 and 1 μM), and after 24 h MTT assays were performed in HEL, HL60, KG1 and MV4-11 cells. The average proliferation values of control untreated samples were taken as 100%. Data are represented as the mean ± s.d. of quadruplicate experiments. (c) AML cells obtained from patients were plated in six-well plates and treated with panobinostat (10 nM) and/or doxorubicin (500 nM). After 18 h, cells were stained with Annexin V-FITC and three monoclonal antibodies for leukemic-associated antigens (CD33-PE, CD34-PerCP and CD45-APC), and the number of Annexin-V-positive events was measured in blast cell and normal residual lymphocytes populations in the sample and normalized to the viable cell fraction in the control, untreated cells, as described in Materials and methods. Results are shown as percentage of apoptotic cells. Apoptosis was not significantly increased in normal lymphocytes with the combination treatment. (d) Box plots of the percentage of apoptosis in the blast population of the six analyzed patients after treatment with the indicated doses. Statistical significance was defined as $P < 0.05$ and was analyzed by using Mann-Whitney U -test.

Doxorubicin potentiates the HDACi activity of panobinostat

On the basis of highly synergistic activity of panobinostat with doxorubicin, we decided to explore the anti-AML mechanism of the drug combination. The effects of the compounds were analyzed, both as single agents and in combination, on gene expression profiles (GEP), cell cycle, apoptosis and signaling pathways in AML cells.

First, we evaluated whether doxorubicin could affect histone acetylation. As shown in Figure 3a, doxorubicin failed to provoke any increase in histone H4 acetylation. In contrast, co-incubation of doxorubicin and panobinostat resulted in a strong potentiation of histone H4 acetylation (Figure 3b).

Panobinostat plus doxorubicin combination provokes unique gene expression modifications

As the drug combination also strongly synergized on histone H4 acetylation and these biochemical modifications are expected to affect a wide array of genes, we decided to perform gene expression profiling to gain further insights into the synergistic effect of panobinostat plus doxorubicin on AML cells.

Changes in the GEP of HEL cells were analyzed before and after treatment with panobinostat (10 nM), doxorubicin (500 nM) and the combination. Array analysis using RNA from three independent experiments was performed using the Affymetrix HG-U133 Plus 2.0 GeneChip, containing 54 613 probe sets. GEP analysis of treated HEL cells identified 285 genes with significantly altered expression (transcriptional changes in gene expression of ≥ 2 -fold) after 24 h of treatment with panobinostat and 43 genes after 24 h of treatment with doxorubicin. However 12 h of treatment with the combination of panobinostat and

doxorubicin was sufficient to induce the deregulation of 841 genes (Figure 3c). Of the 841 genes identified, 588 genes were found to be exclusively affected by the combination. The majority of alterations in gene expression in response to all treatments were found to be due to gene upregulation (data not shown). The above results indicate that the GEP of cells treated with the combination is not simply the sum of genes altered by single-agent treatment.

Analysis of the 588 genes exclusively altered by the drug combination identified cell cycle and apoptosis as the two most significantly affected functional categories (Table 2). Treatment with panobinostat plus doxorubicin resulted in decreased expression of genes involved in cell cycle, such as *Cyclin B1* (FC: -3.04), and increased the expression of *Cyclin G2* (FC: 5.49). The combination treatment also resulted in decreased expression of several genes involved in apoptosis: *AVEN* (FC: -2.58), which acts as an inhibitor of the apoptosome by inhibiting caspase-9 activation,¹⁷ *Bcl-X* (FC: -2.96), *TNFRSF25* (FC: -3.48) or *HSPA5* (FC: -3.87), and increased expression of genes, such as *BTG1* (FC: 5.47), *KLRC1* (FC: 2.34) or *BNIP3L* (FC: 2.17) (Table 2). Moreover, *c-jun* was upregulated after treatment with panobinostat (FC: 3.77) and, particularly, with doxorubicin (FC: 26.30), but the expression was significantly increased upon treatment with the combination (FC: 58.38).

Panobinostat and doxorubicin synergistically induce caspase-dependent cell death

The effect of the panobinostat and doxorubicin combination on apoptotic cell death was next investigated. The combination of panobinostat and doxorubicin induced a significant increase in Annexin-V-positive cells, as compared to either of the two compounds alone (Figure 4a). Treatment with panobinostat plus doxorubicin induced cleavage of poly-(ADP-ribose)polymerase (PARP), caspase-3, -7, -8 and -9, with the generation of active, low molecular weight cleaved fragments within the first 12 h of treatment (Figure 4b). No effect was observed at 24 h with either of the two drugs used alone.

To investigate the role of caspase activation in the anti-leukemic action of panobinostat plus doxorubicin, we assessed the ability of the caspase-3, -8 and -9 inhibitors, ZVAD-FMK, Z-IETD-FMK and Z-LEHD-FMK to inhibit the cytotoxicity of panobinostat plus doxorubicin. HEL cells were preincubated for 60 min with Z-VAD-FMK, Z-IETD-FMK or Z-LEHD-FMK, followed by the addition of panobinostat and doxorubicin for 24 h. As shown in Figure 4c, preincubation with caspase inhibitors resulted in decreased Annexin V staining, suggesting inhibition of compound-induced cell death. Together, these results indicate that the combination of panobinostat and doxorubicin activates the caspase-dependent apoptotic pathway to induce cell death in AML cells.

To further explore the mechanisms of apoptotic cell death induced by panobinostat and doxorubicin, we assessed the effects of treatment on the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$), which reflects the permeability of the mitochondrial outer membrane. Mitochondria are critically involved in the triggering of apoptotic cell death and the loss of mitochondrial membrane potential has been suggested to be one of the earliest events in apoptosis.¹⁸ Analysis of $\Delta\Psi_m$ by the use of the mitochondrial membrane potential probe DioC₆(3) indicated a decrease in $\Delta\Psi_m$ in cells treated with panobinostat plus doxorubicin, and this effect was greater than with either of the two compounds used alone (Figure 4d).

Bcl-2 family members act as important regulators of mitochondrial outer membrane permeability. Western blot

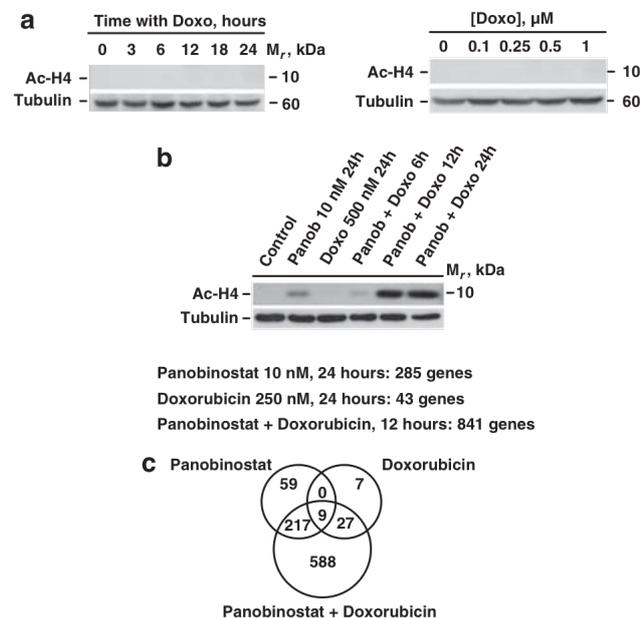


Figure 3 (a) Action of doxorubicin on histone H4 acetylation. Cells were treated for the indicated times with doxorubicin (1 μM, left), and doses for 24 h (right) and acetylated histone H4 was analyzed by western blotting. (b) HEL cells were treated with panobinostat and doxorubicin as single agents and in combination for the indicated times and acetylated histone H4 was analyzed by western blotting. (c) Venn diagram depicting the overlap of deregulated genes in HEL cells after panobinostat, doxorubicin, and panobinostat and doxorubicin treatment.

Table 2 Genes exclusively deregulated by the combination of panobinostat and doxorubicin in AML cells

Probe set	Gene symbol	HEL FC	Description
<i>Cell cycle</i>			
202551_s_at	CRIM1	11.27	Cysteine-rich transmembrane BMP regulator 1 (chordin-like)
202770_s_at	CCNG2	5.49	Cyclin G2
202388_at	RGS2	5.26	Regulator of G-protein signaling 2, 24 kDa
210568_s_at	RECQL	2.90	RecQ protein-like (DNA helicase Q1-like)
201235_s_at	BTG2	2.74	BTG family, member 2
228423_at	MAP9	2.63	Microtubule-associated protein 9
209205_s_at	LMO4	2.41	LIM domain only 4
203409_at	DDB2	2.40	Damage-specific DNA-binding protein 2, 48 kDa
206499_s_at	RCC1	-2.10	Regulator of chromosome condensation 1
202556_s_at	MCRS1	-2.33	Microspherule protein 1
227237_x_at	ATAD3B	-2.40	ATPase family, AAA domain containing 3B
203425_s_at	IGFBP5	-2.46	Insulin-like growth factor binding protein 5
228729_at	CCNB1	-3.04	Cyclin B1
218529_at	CD320	-3.21	CD320 molecule
1552641_s_at	ATAD3A	-3.38	ATPase family, AAA domain containing 3A
<i>Apoptosis</i>			
200920_s_at	BTG1	5.47	B-cell translocation gene 1, anti-proliferative
209723_at	SERPINB9	4.95	Serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 9
206907_at	TNFSF9	3.74	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9
204415_at	IFI6	2.51	Interferon, α -inducible protein 6
201301_s_at	ANXA4	2.48	Annexin A4
202468_s_at	CTNNA1	2.36	Catenin (cadherin-associated protein), α -like 1
206785_s_at	KLRC1	2.34	Killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 1
218573_at	MAGEH1	2.29	Melanoma antigen family H, 1
221479_s_at	BNIP3L	2.17	BCL2/adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 3-like
219478_at	WFDC1	-2.56	WAP four-disulfide core domain 1
219366_at	AVEN	-2.58	Apoptosis, caspase activation inhibitor
203005_at	LTBR	-2.68	Lymphotoxin β -receptor (TNFR superfamily, member 3)
215037_s_at	BCL2L1	-2.96	BCL2-like 1
210847_x_at	PLEKHG5	-3.15	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25
219423_x_at	TNFRSF25	-3.48	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25
211936_at	HSPA5	-3.87	Heat shock 70 kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78 kDa)

HEL cells were treated with panobinostat (10 nM), doxorubicin (500 nM) or the combination of both. RNA was isolated, and GEP analysis was performed as described in Materials and methods.

analyses demonstrated that the combination of panobinostat and doxorubicin induced the cleavage of the antiapoptotic protein Bcl-X, although the levels of Bcl-2 or Mcl-1 were unaffected as compared with single-agent doxorubicin treatment (Figure 4e). Regarding the proapoptotic Bcl-2 family members, only a modest increase in some of them such as Bad or Bak was observed with the combination (Figure 4e).

The increase in mitochondrial outer membrane permeability favors the release of cytochrome *c* that together with caspase-9 and Apaf-1 constitutes the apoptosome, a macromolecular structure that causes activation of the effector, caspase-3.¹⁸ Subcellular fractionation of HEL cells treated for 24 h with panobinostat, doxorubicin or both revealed that the combination caused a treatment-dependent translocation of cytochrome *c* from the mitochondrial to the cytosolic fraction (Figure 4e). Neither panobinostat nor doxorubicin single agents were found to induce release of cytochrome *c*.

Panobinostat and doxorubicin provoke a DNA damage response

To assess if the increase in apoptosis also reflected DNA damage, we evaluated the phosphorylation of H2AX, a surrogate marker of DNA DSB. Treatment of HEL cells with panobinostat plus doxorubicin induced a marked H2AX phosphorylation after 24 h of incubation (Figure 5a), whereas this increase was not detected in cells treated with panobinostat

or doxorubicin as single agents. This suggests that the induction of DNA damage may be a consequence of the mechanism of action of the combination. Western blotting studies of other proteins related with DNA damage pathway indicated that the double combination of panobinostat and doxorubicin upregulated the levels of pATM after 6 h of treatment and downregulated the levels of pCHK1, pCHK2 and RAD54B, all substrates of ATM. Western blot analyses also demonstrated that the combination of panobinostat and doxorubicin induced the inactivation/cleavage of RAD51. RAD51 participates in the DNA response pathway and it is associated with the activation of double-strand break (DSBs) repair.¹⁹ These studies confirmed that panobinostat plus doxorubicin provoked a DNA damage response (DDR) probably after inducing DSBs in the DNA.

Discussion

Over the past 30 years, there has been minimal progress in the treatment of AML, and a substantial proportion of patients either fail to respond to induction treatment or eventually relapse. AML has become recognized as a paradigm of epigenetic deregulation in cancer. Compounds such as HDACi, which target epigenetic processes, may thus represent a novel therapeutic approach to AML, and several agents have shown preliminary efficacy in AML.

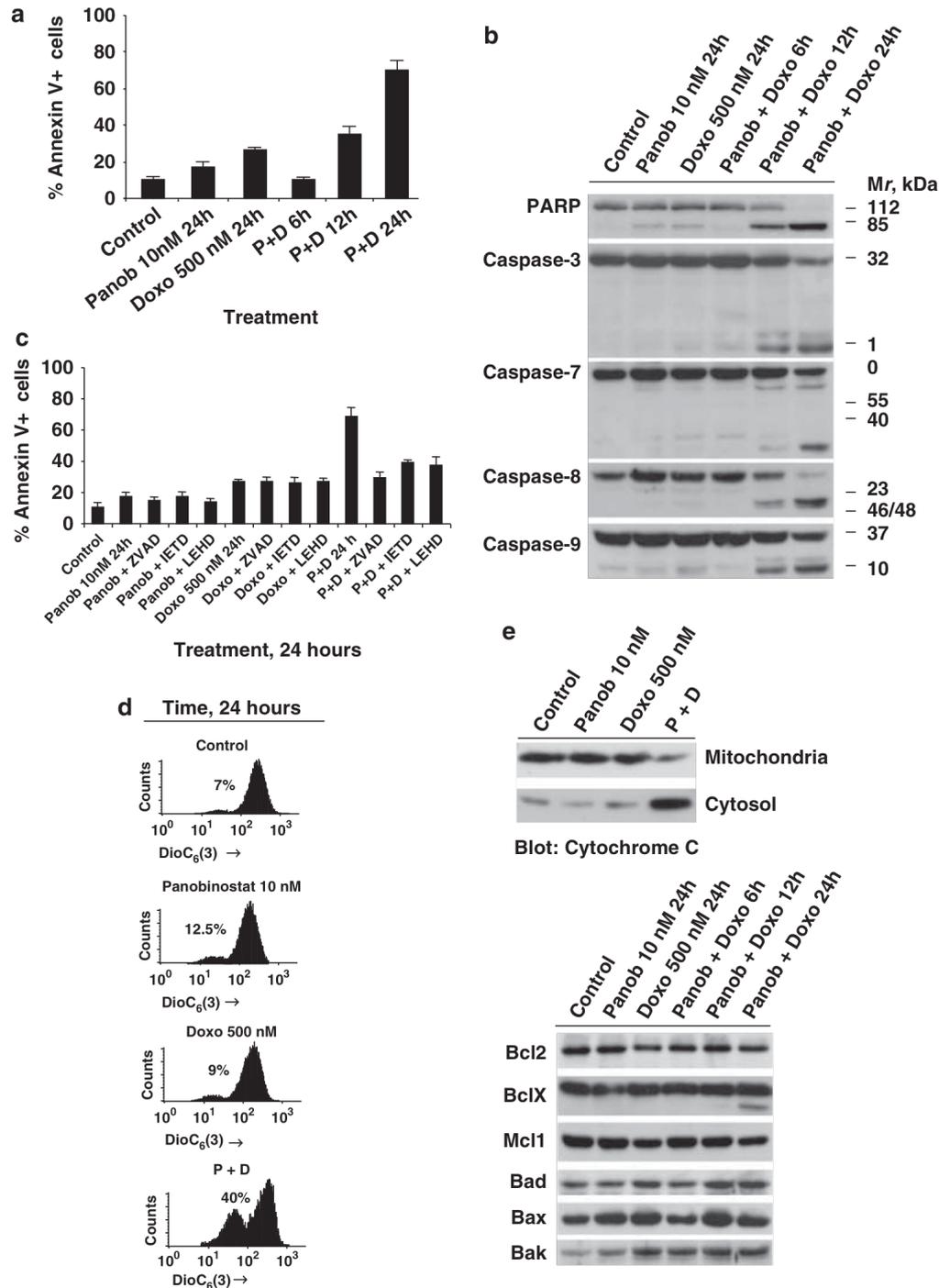


Figure 4 Panobinostat and doxorubicin induce synergistic apoptosis. **(a)** Time-course experiment with panobinostat and doxorubicin showing increasing cell death (Annexin-V-positive cells). **(b)** HEL cells were treated with panobinostat (10 nM), doxorubicin (500 nM), or the combination for the indicated times and expression of poly-(ADP-ribose)polymerase (PARP), caspase-3, -7, -8 and -9 proteins was analyzed by western blotting. **(c)** Effect of the caspase-3, -8 and -9 inhibitors, Z-VAD-FMK, Z-IETD-FMK and Z-LEHD-FMK on panobinostat plus doxorubicin-induced cell death. HEL cells were plated and pretreated as indicated with Z-VAD-FMK (50 μ M), Z-IETD-FMK (50 μ M) or Z-LEHD-FMK (50 μ M) for 60 min. Panobinostat (10 nM) and doxorubicin (500 nM) were added to the corresponding samples followed by a 24 h incubation. Induction of cell death in each condition was assessed by Annexin V staining. **(d)** Panobinostat and doxorubicin induce $\Delta\Psi_m$ disruption. HEL cells were treated with panobinostat (10 nM) and doxorubicin (500 nM), and $\Delta\Psi_m$ analyses were performed with DiOC₆(3)^{low} by flow cytometry. **(e)** HEL cells were treated for the indicated times with panobinostat (10 nM) and doxorubicin (500 nM), Bcl-2 family members and the subcellular distribution of cytochrome *c* in mitochondrial and cytosolic fractions analyzed by western blotting.

In the present study, we have evaluated the effects of HDAC inhibition by panobinostat used both as single agent and in combination with several standard-of-care agents. Panobinostat

demonstrated significantly greater potency in AML cell lines compared to Ara-C, fludarabine and doxorubicin, as indicated by IC₅₀ values in the low nanomolar range. Moreover,

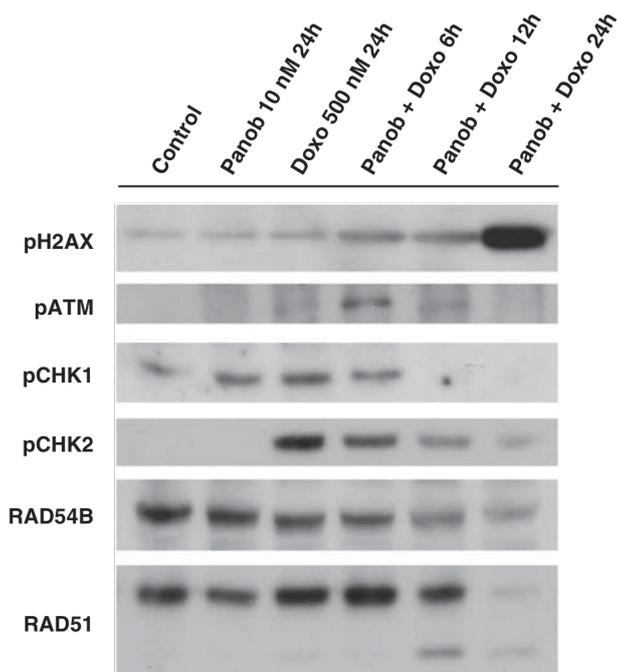


Figure 5 Effects of panobinostat and doxorubicin on proteins involved in DNA damage response. HEL cells were treated with panobinostat (10 nM), doxorubicin (500 nM), or the combination for the indicated times and expression of pH2AX, pATM, pCHK1, pCHK2, RAD54B and RAD51 was analyzed by western blotting.

panobinostat was also effective on patient blast cells, with low toxicity on normal lymphocytes. The potency of panobinostat is also notable compared to other HDAC inhibitors including vorinostat,^{20,21} MS275,^{21–23} VPA,^{21,24,25} ITF2357²⁶ and TSA,^{27,28} which have demonstrated activity in AML cells at micromolar concentrations. The observed anticancer activity of panobinostat in AML is consistent with the activity observed in other tumor models.^{12,13,29} In addition to potency, the compound demonstrates significant synergistic inhibition of cell viability in combination with Ara-C, and particularly with doxorubicin, in all AML cell lines tested, as well as in primary leukemic cells from patients. These results suggest that the inhibition of HDAC activity, combined with doxorubicin, may be highly effective in inducing anticancer effects in AML patients.

The analysis of the mechanism of action of panobinostat plus doxorubicin indicates that this combination affects several pathways involved in the control of cell-cycle progression, apoptosis and DDR. Notably, the combination was found to deregulate a substantial number of genes that were not affected by the compounds as single agents. Therefore, the action of the combined treatment cannot be explained as a mere addition of the effects of the single-drug treatments. Thus, new signaling routes may be affected by the drug combination.

Panobinostat plus doxorubicin was found to induce AML cell death through caspase-dependent apoptosis. Bcl-2 family members have been shown to regulate mitochondrial outer membrane permeability,^{18,30} and the loss of the mitochondrial membrane potential has also been shown to reflect an increase in the permeability of the outer mitochondrial membrane allowing the release of proapoptotic proteins such as cytochrome *c*. Panobinostat plus doxorubicin caused the release of cytochrome *c* from mitochondria into the cytosol, caspase-9

and -3 cleavage, and PARP cleavage. The importance of the activation of caspases in panobinostat plus doxorubicin-induced cell death was demonstrated using caspase inhibitors, of which the pan-caspase inhibitor, Z-VAD-FMK, was the most efficient in preventing the treatment-dependent induction of apoptosis. These data identify caspase-dependent apoptosis in the mechanism of action of the cytotoxic effects of panobinostat plus doxorubicin in AML. Although the release of cytochrome *c* and caspase cleavage are involved in the mechanism of action of other HDAC inhibitors and doxorubicin, this effect was clearly more potent in AML cells treated with the combination of panobinostat and doxorubicin.

In addition to the observed effects, the combination of panobinostat and doxorubicin also triggers DDR, as indicated by its action on pH2AX and the deregulation of several proteins implicated in the ATM and DNA repair pathways. These studies confirmed that panobinostat plus doxorubicin provoked a DDR response probably after inducing DSBs in the DNA.

The lower doses and shorter duration of treatment required for the antileukemic effects of the combination, together with the observed cancer-cell-specific activity, may translate into decreased toxicity for normal cells, indicating a potential favorable therapeutic window. The doses used in the *in vitro* experiments correspond to clinically achievable concentrations observed in phase I trials. Moreover, the absence of differences in efficacy observed with simultaneous compared to sequential treatment would probably favor a schedule using first anthracycline at conventional dose (with or without cytarabine) followed by low doses of panobinostat (starting from 20 mg up to 40 mg, 3 days per week), to maintain the efficacy of both drugs and try to diminish the potential toxicity.

In summary, we have identified a synergistic cytotoxicity and a mechanism of action for the combination of panobinostat and doxorubicin in AML. Our preclinical studies suggest that the efficacy of the combination of panobinostat and doxorubicin in the treatment of AML merits investigation in the clinic. As a matter of fact, these preclinical data have seeded the design of a clinical trial in AML that is being developed in our University Hospital.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Ministry of Science and Innovation of Spain (BFU2006-01813/BMC and RD06/0020/0041). The CIC receives support from the European Community through the regional development funding program (FEDER). PM was supported by the FIS-FEDER through projects to JSM, and a Spanish Myeloma Network Program (G03/136). EMO was supported by the 'Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (I + D + I)' and by 'Instituto de Salud Carlos III-Fondo de Investigación Sanitaria' with reference number 400001. MG was supported by the 'Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (I + D + I)' and by 'Instituto de Salud Carlos III-Fondo de Investigación Sanitaria' with expedient number 05/0279. PA is an employee of Novartis Pharmaceuticals. This work was supported by the 'Acción Transversal del Cáncer' project, through an agreement between Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Spanish Ministry of Science and Innovation, and the Cancer Research

Foundation of Salamanca University. Our group also receives support from the Junta de Castilla y León through 'Ayudas destinadas a financiar programas de actividad investigadora a realizar por grupos de investigación de excelencia de Castilla y León'.

References

- 1 Estey E, Dohner H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet* 2006; **368**: 1894–1907.
- 2 Tallman MS, Gilliland DG, Rowe JM. Drug therapy for acute myeloid leukemia. *Blood* 2005; **106**: 1154–1163.
- 3 Yates JW, Wallace Jr HJ, Ellsion RR, Holland JF. Cytosine arabinoside (NSC-63878) and daunorubicin (NSC-83142) therapy in acute nonlymphocytic leukemia. *Cancer Chemother Rep* 1973; **57**: 485–488.
- 4 Jones LK, Saha V. Chromatin modification, leukaemia and implications for therapy. *Br J Haematol* 2002; **118**: 714–727.
- 5 Caron C, Boyault C, Khochbin S. Regulatory cross-talk between lysine acetylation and ubiquitination: role in the control of protein stability. *Bioessays* 2005; **27**: 408–415.
- 6 Sengupta N, Seto E. Regulation of histone deacetylase activities. *J Cell Biochem* 2004; **93**: 57–67.
- 7 Marks P, Rifkind RA, Richon VM, Breslow R, Miller T, Kelly WK. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat Rev Cancer* 2001; **1**: 194–202.
- 8 Timmermann S, Lehrmann H, Poleskaya A, Harel-Bellan A. Histone acetylation and disease. *Cell Mol Life Sci* 2001; **58**: 728–736.
- 9 Dokmanovic M, Clarke C, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives. *Mol Cancer Res* 2007; **5**: 981–989.
- 10 Xu WS, Parmigiani RB, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene* 2007; **26**: 5541–5552.
- 11 Garcia-Manero G, Yang H, Bueso-Ramos C, Ferrajoli A, Cortes J, Wierda WG *et al*. Phase 1 study of the histone deacetylase inhibitor vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid [SAHA]) in patients with advanced leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood* 2008; **111**: 1060–1066.
- 12 Drummond DC, Noble CO, Kirpotin DB, Guo Z, Scott GK, Benz CC. Clinical development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005; **45**: 495–528.
- 13 Maiso P, Carvajal-Vergara X, Ocio EM, Lopez-Perez R, Mateo G, Gutierrez N *et al*. The histone deacetylase inhibitor LBH589 is a potent antimyeloma agent that overcomes drug resistance. *Cancer Res* 2006; **66**: 5781–5789.
- 14 Miller TA, Witter DJ, Belvedere S. Histone deacetylase inhibitors. *J Med Chem* 2003; **46**: 5097–5116.
- 15 Colado E, varez-Fernandez S, Maiso P, Martin-Sanchez J, Vidriales MB, Garayoa M *et al*. The effect of the proteasome inhibitor bortezomib on acute myeloid leukemia cells and drug resistance associated with the CD34+ immature phenotype. *Haematologica* 2008; **93**: 57–66.
- 16 Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose–effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* 1984; **22**: 27–55.
- 17 Chau BN, Cheng EH, Kerr DA, Hardwick JM. Aven, a novel inhibitor of caspase activation, binds Bcl-xL and Apaf-1. *Mol Cell* 2000; **6**: 31–40.
- 18 Kroemer G, Petit P, Zamzami N, Vayssiere JL, Mignotte B. The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J* 1995; **9**: 1277–1287.
- 19 Huang Y, Nakada S, Ishiko T, Utsugisawa T, Datta R, Kharbanda S *et al*. Role for caspase-mediated cleavage of Rad51 in induction of apoptosis by DNA damage. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 2986–2997.
- 20 Amin HM, Saeed S, Alkan S. Histone deacetylase inhibitors induce caspase-dependent apoptosis and downregulation of daxx in acute promyelocytic leukaemia with t(15;17). *Br J Haematol* 2001; **115**: 287–297.
- 21 Nebbioso A, Clarke N, Voltz E, Germain E, Ambrosino C, Bontempo P *et al*. Tumor-selective action of HDAC inhibitors involves TRAIL induction in acute myeloid leukemia cells. *Nat Med* 2005; **11**: 77–84.
- 22 Saito A, Yamashita T, Mariko Y, Nosaka Y, Tsuchiya K, Ando T *et al*. A synthetic inhibitor of histone deacetylase, MS-27-275, with marked *in vivo* antitumor activity against human tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 4592–4597.
- 23 Suzuki T, Ando T, Tsuchiya K, Fukazawa N, Saito A, Mariko Y *et al*. Synthesis and histone deacetylase inhibitory activity of new benzamide derivatives. *J Med Chem* 1999; **42**: 3001–3003.
- 24 Gottlicher M, Minucci S, Zhu P, Kramer OH, Schimpf A, Giavara S *et al*. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J* 2001; **20**: 6969–6978.
- 25 Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA, Klein PS. Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J Biol Chem* 2001; **276**: 36734–36741.
- 26 Barbetti V, Gozzini A, Rovida E, Morandi A, Spinelli E, Fossati G *et al*. Selective anti-leukaemic activity of low-dose histone deacetylase inhibitor ITF2357 on AML1/ETO-positive cells. *Oncogene* 2008; **27**: 1767–1778.
- 27 Henderson C, Mizzau M, Paroni G, Maestro R, Schneider C, Brancolini C. Role of caspases, Bid, and p53 in the apoptotic response triggered by histone deacetylase inhibitors trichostatin-A (TSA) and suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA). *J Biol Chem* 2003; **278**: 12579–12589.
- 28 Qi H, Ratnam M. Synergistic induction of folate receptor beta by all-*trans* retinoic acid and histone deacetylase inhibitors in acute myelogenous leukemia cells: mechanism and utility in enhancing selective growth inhibition by antifolates. *Cancer Res* 2006; **66**: 5875–5882.
- 29 Beckers T, Burkhardt C, Wieland H, Gimmnich P, Ciossek T, Maier T *et al*. Distinct pharmacological properties of second generation HDAC inhibitors with the benzamide or hydroxamate head group. *Int J Cancer* 2007; **121**: 1138–1148.
- 30 Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 2004; **116**: 205–219.

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

CAPÍTULO 3: Zalypsis en LAM

Una de las fuentes de nuevos fármacos que mayor importancia ha ganado en los últimos años ha sido el entorno marino. Zalypsis es un alcaloide sintético relacionado con la familia de la Jorumycina, Renieramycinas, and Safracinas and Saframycinas que ha demostrado eficacia en varios modelos tumorales, y que se encuentra en investigación clínica. En este capítulo se presenta la evaluación de los efectos de Zalypsis en monoterapia y en combinación con agentes convencionales en el tratamiento de la LAM. Zalypsis presenta un alto efecto antileucémico, tanto en líneas celulares como en muestras obtenidas de pacientes en el momento del diagnóstico de la LAM, incluso a concentraciones menores que fármacos convencionales como doxorubicina, citarabina y fludarabina, con una IC50 en el rango nanomolar bajo. Más importante, Zalypsis presenta un claro efecto sinérgico con fármacos utilizados habitualmente en el tratamiento de las leucemias agudas mieloblásticas como la citarabina, la daunorubicina y la fludarabina, además de con el bortezomib. Un aspecto importante es que Zalypsis fue eficaz en líneas celulares en las que no existía una proteína p53 funcional y en muestras de pacientes con características biológicas de mal pronóstico. En cuanto a la toxicidad, Zalypsis no resulta tóxico para las células hemoyéticas normales obtenidas de pacientes sin tratamiento y sin patología mieloide, aunque mantiene una gran actividad sobre las células leucémicas más inmaduras, lo que indica que es un fármaco potencialmente capaz de erradicar las células madre leucémicas, que son las responsables de las recaídas de los pacientes.

En cuanto a su mecanismo de acción, Zalypsis induce apoptosis por vías dependientes de caspasas e independientes de caspasas. El análisis del perfil de expresión génica permitió identificar a un conjunto de genes implicados en el reconocimiento de roturas de doble hebra de ADN los genes del complejo de

Anemia de Fanconi o BRCA1, pero también genes implicados en la reparación de dichas roturas, como RAD51, RAD54 y BRCA2. Esto se pudo comprobar también a nivel protéico, detectando aumento de pCHK1, pCHK2, pH2AX y GADD45B. Además de los genes implicados en la detección y reparación de daño al DNA, Zalypsis también derreguló un gran número de genes implicados en otras funciones como la transcripción o la replicación del ADN.

En resumen, la potente actividad antileucémica de Zalypsis, incluso en poblaciones blásticas inmaduras, probablemente mediante daño directo al ADN merece ser evaluada en un ensayo clínico en pacientes con leucemia aguda mieloblástica.

**ZALYPSIS DISPLAYS PRECLINICAL ACTIVITY IN ACUTE MYELOID
BLASTS AND LEUKEMIC PROGENITOR CELLS THROUGH THE
INDUCTION OF A DNA DAMAGE RESPONSE**

Enrique Colado^{1,2}, Teresa Paíno¹, Patricia Maiso¹, Enrique M. Ocio^{1,2}, Xi Chen¹,
Stela Álvarez-Fernández¹, Norma C. Gutiérrez^{1,2}, Jesús Martín-Sánchez^{1,2}, Juan Flores
Montero¹, Laura San Segundo¹, Mercedes Garayoa¹, Diego Fernández-Lázaro¹, Maria
Belen Vidriales², Carlos M. Galmarini³, Pablo Avilés³, Carmen Cuevas³, Atanasio
Pandiella¹ and Jesús F. San Miguel^{1,2}.

¹Centro de Investigación del Cáncer, IBMCC/CSIC-Universidad de Salamanca,

²Hospital Universitario de Salamanca, Spain, and ³PharmaMar, Madrid, Spain

Word Count: 3289

Abstract Word count: 199

Keywords: Acute Myeloid Leukemia, DNA damage, novel drugs

Corresponding author:

Jesus. F. San-Miguel,

Servicio de Hematología,

Hospital Universitario de Salamanca,

Paseo de San Vicente s/n, 37007, Salamanca, Spain.

Telephone: 0034 923219384

E-mail: sanmigiz@aida.usal.es

Abstract

Although the majority of AML patients initially respond to conventional chemotherapy, relapse is still the leading cause of death, probably due to the presence of leukemic stem cells, which are insensitive to current therapies. Novel drugs are necessary for these patients, and, in this regard, Zalypsis is a novel alkaloid from marine origin, that showed a very potent antileukemic activity in the four AML cell lines tested and that potentiated the effect of conventional antileukemic drugs such as cytarabine, fludarabine and daunorubicine. Interestingly, Zalypsis showed remarkable *ex vivo* potency in freshly isolated blasts from AML patients, including the most immature blast cells (CD34+ CD38- Lin-) where the leukemic stem cells are found. Zalypsis-induced apoptosis was the result of an important deregulation of genes involved in DSB recognition such as Fanconi Anemia genes and BRCA1; but also genes implicated in DSB reparation, such as RAD51, RAD54 and BRCA2. This was also confirmed by an increase in several proteins involved in this pathway (CHK1, CHK2 and pH2AX). The potent and selective antileukemic effect observed in AML cell lines and in patient's samples through a DNA damage response, provides the rationale for the investigation of Zalypsis in clinical trials.

Introduction

Acute Myeloid Leukaemia (AML) is a heterogeneous clonal disorder of haematopoietic progenitor cells that lose their ability to normally differentiate and to respond to normal regulators of proliferation.(1-3) Treatment of AML has traditionally relied in the combination of the pyrimidine analogue cytarabine (araC), with anthracycline antibiotics such as daunorubicin, and has not evolved for more than 30 years.(1, 4) Although the majority of patients initially respond, relapse is still the leading cause of death in AML, probably due, among other reasons, to the presence of leukemic stem cells, which are relatively insensitive to current therapies.(5, 6). This is especially notorious in complex karyotype and secondary AML patients, who have a dismal prognosis.(3, 7) Several cytogenetic abnormalities such as TP53 mutations are particularly frequent in this subset of patients with bad prognosis. (8-14) In this regard, the presence of a functional p53 is necessary for the induction of cell death caused by most antitumoral agents, whereas a non functional p53 is clearly associated with the development of drug resistance.(15)

One of the sources of drugs which has gained interest in the last years is the marine environment. (16) The antitumoral activity of many compounds obtained from tunicates and other sea organisms is being tested in preclinical and clinical studies, and some of them, such as Yondelis®, have already been approved for the treatment of advanced soft tissue sarcomas and ovarian cancer.(17) Zalypsis (PM00104) is a new synthetic alkaloid related to Jorumycin, Renieramycins, and Safracins and Saframycins. Zalypsis has demonstrated significant *in vitro* and *in vivo* activity against human solid and haematological neoplasms via p53 dependent and p53 independent mechanisms, (18, 19) Zalypsis is currently evaluated in early phase clinical trials in solid organ neoplasms and in multiple myeloma.

In the present paper, we have investigated the activity and mechanism of action of Zalypsis in AML cell lines and patient samples with different biological and cytogenetic characteristics. Zalypsis resulted to be a very effective antileukemic agent both *in vitro* and *ex vivo*, even in samples of patients with cytogenetic and molecular features of bad prognosis. Noteworthy, Zalypsis was effective against both mature and immature blast cell populations while preserving normal hemopoietic stem cells, suggesting a selective effect, and also potentiated other agents currently used in AML treatment. All these activities are mediated, at least in part, by the induction of DNA

Zalypsis in AML

damage and the subsequent cellular response. The potent and widespread antileukemic activity of Zalypsis together with the toxicity profile shown in phase I clinical trials supports the development of *ad hoc* clinical trials to evaluate its therapeutic role in relapsed/refractory AML patients.

Materials and methods

Reagents and immunochemicals

Cell culture media, serum and penicillin-streptomycin were from Invitrogen Corporation (Gaithersburg, Md.). Zalypsis was provided by PharmaMar S.A:U., (Madrid, Spain and Cambridge, MA, USA). Daunorubicin, cytarabine (Ara-C) and fludarabine were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Annexin V-FITC was obtained from BD Biosciences (San Diego, CA). Z-VAD-FMK, was purchased from Calbiochem (San Diego, CA). Other generic chemicals were purchased from Sigma-Aldrich, Roche Biochemicals (Mannheim, Germany), or Merck (Darmstadt, Germany).

The origins of the different monoclonal antibodies employed in the Western Blotting analyses were as follows: anti-Bcl-2 and anti-Mcl-1 were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA); anti-p53, anti-Bcl-XL, anti-PARP, anti-caspase-3, anti-caspase-7, anti-caspase-8 and anti-caspase-9 from Cell Signalling (Boston, MA); the anti-Cytochrome C, from BD Biosciences. The HRP-conjugated secondary antibodies were from Amersham (Buckinghamshire, UK).

Cell culture; cell proliferation, cell cycle, and apoptosis analyses; and Western blotting and subcellular fractionation procedures.

The source and the culture conditions of the AML cell lines as well as the detailed methodology to analyse proliferation of AML cells using MTT, cell cycle profiles, cytometric evaluation of apoptosis in AML cell lines using Annexin-V-FITC, mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$), subcellular fractionation and Western blotting has been previously described.(20)

For combination experiments, we used suboptimal doses of these compounds for 24 and 48 hours, and analyzed the potency of the combination by MTT absorbance assays, followed by analysis of the data by the Calcsyn program, as previously reported.(21, 22)

Ex vivo experiments in freshly isolated AML cells

The cytometric analyses of apoptosis have been described elsewhere.(20) Briefly, bone

Zalypsis in AML

marrow (BM) cells were obtained from 10 AML patients at diagnosis before any treatment. The biological characteristics of these patients are summarized in Table 1. 1×10^6 BM cells were incubated in six-well plates with Zalypsis (10 nM) for 18 h at 37 °C in a humidified atmosphere in the presence of 5% CO₂-95% air. Using quadruple staining, we were able to identify the blast cell population (CD34-/+ , CD33-/+ , CD45dim)(23) and the population of the most immature blasts where leukemic stem cells are found (CD34+ , CD38- , Lin-), and accurately quantify the number of apoptotic cells in each cell population.(24-26) In addition, the toxicity on normal hematopoietic progenitor cells (CD34+) was analyzed in bone marrow samples from 4 non-leukemic patients. In all cases, the percentage of apoptotic events was corrected according to the proportion of apoptotic cells in the control (untreated) cells. The monoclonal antibodies used for these experiments were: anti-CD33-PE; anti-CD45-PerCP; anti-CD34-APC; anti-CD64-PE; anti-CD19-PerCP-Cy5.5; anti-CD45-AmCyan and anti-CD38-Alexa-Fluor-700 (BD Biosciences, San Diego, CA).

Microarray RNA analyses

HEL and HL60 cells were treated with Zalypsis (10 nM) for 16 hours in order to obtain a 20% of apoptosis assessed by annexin-V staining.(21) At this time point, the total RNA was extracted using Trizol reagent (Life Technologies, MD, USA) and purified with RNAeasy Mini Kit (Qiagen, CA, USA). RNA integrity was verified with the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, CA, USA). Double-stranded cDNA and biotinylated cRNA were synthesized with T7-polyT primer and the BioArray RNA labeling kit (Enzo, NY, USA), respectively. The labeled RNA was then fragmented and hybridized to HG-U133 Plus 2.0 oligonucleotide arrays (Affymetrix, CA, USA), which were scanned in a Gene Array Scanner and analyzed using the DNA-Chip Analyzer software (DChip) and Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity Systems, California, USA). Changes in gene expression greater than two-fold were considered significant.

Results

Zalypsis displays potent antileukemic activity and potentiates conventional antileukemic agents

To test the antiproliferative/cytotoxic effect of Zalypsis against AML cells, four cell lines were

Zalypsis in AML

treated with increasing concentrations of the compound (0.1-100 nM) for 24 and 48 hours, and the viability was analyzed by MTT assay (Figure 1A). Zalypsis showed a very potent antileukemic activity in the four AML cell lines tested, with IC50s at 48 hours below 1 nM. When compared with the in vitro activity of conventional antileukemic agents, the potency of Zalypsis turned out to be 10 to 100 times higher than that of cytarabine, daunorubicine or fludarabine (data not shown).

To investigate if Zalypsis could increase the activity of AML standard of care- drugs, two different cell lines, HEL and HL60 cells originally derived from a FAB M2 and a erithroid leukemia respectively, were treated with several combinations of Zalypsis and some conventional antileukemic drugs (cytarabine, daunorubicin, fludarabine and bortezomib). The greater potentiation in the case of HL-60 cells was observed at shorter time points (24 hours), probably due to the higher potency of Zalypsis in this cell line, whereas in HEL cells, for a similar activity 48 hours were required. Zalypsis increased the effect of all these anti-AML drugs, being the most potent combination in both cell lines the one that included an anthracyclin such as daunorubicine. Zalypsis was also a good partner for cytarabine and fludarabine, whereas only a modest effect was observed in the combination with bortezomib. (Figure 1B)

Zalypsis targets both mature and immature blast cells

We next analyzed the activity of Zalypsis in freshly isolated blast cells from 10 AML patients by using multiparametric flow cytometry that allows the identification of the blast cells, and, more interestingly, the discrimination between the more mature leukemic cell populations (CD34-/+ , CD33-/+ , CD45dim) and the most immature (CD34+ , CD38- , Lin-) one.(6, 27) At concentrations that can be clinically achieved in the plasma of treated patients, Zalypsis, induced significant cell death in the blast population in all cases analyzed (Figure 1C) which, interestingly, included patients with good, normal and bad cytogenetic prognosis based on karyotypic abnormalities or molecular mutations (Table 1). In four of these patients we could also analyze the efficacy of Zalypsis in the most immature blast population where the leukemic stem cells are supposed to be and, in all cases, this population was also sensitive to Zalypsis (Figure 1 C,D). We finally studied the activity of this drug in non tumoral CD34+ BM progenitor obtained from four non-AML samples. In these samples, the CD34+ progenitors were preserved after treatment with Zalypsis (Figure 1C), specially the CD34+CD38-Lin- population that represents the compartment of the non-lineage committed

Zalypsis in AML

hemopoietic progenitors (data not shown). These findings suggest that, although Zalypsis may target the leukemic stem cell compartment, the cytopenias caused by the treatment would be reversible, since the normal immature hemopoietic precursor cells are preserved.

Zalypsis induces apoptosis in AML cells

To assess if the decrease of the MTT uptake induced by Zalypsis was due to cell cycle blockade, an increase in cytotoxicity, or both, HEL and HL60 cells were treated with Zalypsis (10 nM) for different times, and, afterwards, changes in cell cycle profiles and in apoptotic induction were analyzed by flow cytometry. PI staining did not show significant changes in the cell cycle phases (data not shown). By contrast, a significant time dependent induction of Annexin V-positive cells after treatment with Zalypsis was observed (Figure 2A) and, accordingly, Zalypsis induced DNA laddering both in HL-60 and HEL cell lines (Figure 2B). We next evaluated the biochemical parameters that are affected upon apoptotic cell death. Zalypsis provoked PARP, Caspase-3, Caspase-7, Caspase-8 and Caspase-9 cleavage, with generation of active cleaved fragments in both cell lines (Figure 2C). This indicates that Zalypsis executed its action by activating both the intrinsic and the extrinsic apoptotic pathways.(28) Interestingly, and concordant with the results of the Annexin V experiments, the cleavage of these proteins was more precocious for HL60 than for HEL: thus, while the processing of PARP, effector caspases 3 and 7, and caspase 8 required 24 hours of treatment with Zalypsis in HEL cell line, it was already observed at 12h in HL60. Cleavage of caspase 9 was the first biochemical process observed, after 6 hours in HL60 and after 12 hours in HEL.

Zalypsis deregulates mitochondrial permeability in AML cells

As cleavage of caspase 9 is a very early event in Zalypsis induced apoptosis, and this change indicates activation of the intrinsic pathway of apoptosis, we next studied the effect of Zalypsis on the mitochondria, which is critically involved in the triggering of apoptotic cell death through this pathway. For this purpose we firstly used the DioC6(3) dye to explore whether Zalypsis was able to induce changes in the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$), a situation that results in an increase in the mitochondrial outer membrane permeability.(29) A decrease in $\Delta\Psi_m$ upon treatment with Zalypsis was observed in both cell lines, and this change was earlier for HL60 (observed after 6 hours), than for HEL cells (24 hours) (Figure 2D).

Zalypsis in AML

Bcl-2 family members act as important regulators of mitochondrial outer membrane permeability. Western blot analyses indicated that this drug down-regulated Bcl-2 in both cell lines, as shown in figure 2E. When other BCL2 family members such as MCL-1 or BLC-XL were studied, they were processed only in HL60 cells after treatment with Zalypsis, and their level was stable or even increased in HEL cell line, probably acting as a paradoxically surviving signal in order to counterbalance the cytotoxic activity of Zalypsis.

Zalypsis induces cell death through caspase-dependent and caspase-independent pathways.

The increase in mitochondrial outer membrane permeability also favours the release of mediators of the intrinsic pathway of apoptosis such as cytochrome C that together with APAF-1 and caspase 9 forms the apoptosome. Subcellular fractionation of HEL and HL60 cells treated for 18 hours with Zalypsis showed that this drug caused a translocation of cytochrome C from the mitochondrial to the cytosolic fraction after treatment (Figure 3A), confirming the activation of the intrinsic pathway of apoptosis. To further investigate the importance of caspases in the anti-leukemic action of Zalypsis, the ability of the pancaspase inhibitor Z-VAD-FMK to rescue from Zalypsis-induced cell death was also evaluated.(30) Cells were preincubated for 60 minutes with Z-VAD-FMK, then Zalypsis was added, and the incubation continued for 24 hours. As shown in Figure 3B, preincubation with the caspase-3 inhibitor did not abrogate cell death in HEL cell line and only a mild effect was observed in HL60 cells. In line with these results, AIF, one of the proteins involved in caspase independent apoptosis, is also released into the cytosol (Figure 3B) after treatment with Zalypsis. These results indicated that both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms are implicated in Zalypsis induced apoptosis.

Zalypsis induces a profound gene deregulation.

To further investigate the mechanism of action of Zalypsis, we analyzed the changes induced upon treatment in the gene expression profile of two AML cell lines. Using a fold-change of 2, a total of 1685 genes were deregulated in HEL after treatment with Zalypsis, whereas in HL60 cell line a more profound gene expression deregulation was observed, with 5576 altered genes. Most of these genes were down-regulated after treatment with the drug. The most significantly deregulated

Zalypsis in AML

functional categories were cell cycle (568 and 606 molecules, respectively), DNA replication, recombination and repair (333 and 424 molecules, respectively), RNA post-transcriptional modification (96 and 173 molecules, respectively) and cell death (823 and 967 molecules, respectively).

Interestingly 934 genes were commonly deregulated in both cell lines. (Figure 4A) When we focused in this group of genes, an important number of DNA damage response (DDR) genes were found to be deregulated. (Table 2) Among these genes some implicated in DSB (Double Strand Break) recognition such as Fanconi Anemia genes and BRCA1 were present; but also genes implicated in DSB reparation, such as RAD51, RAD54 and BRCA2. Therefore, a possible mechanism of action for Zalypsis is the induction of DNA double strand breaks (DSB). The MRN complex is composed of Mre11, Rad50 and Nbs1, which acts as a DSB sensor and recruits the ATM kinase to sites of broken DNA, therefore this complex plays a key role in the immediate early response to DNA damage.(31-33) Under these circumstances, ATM is activated and phosphorylates substrates such as Histone H2AX and CHK2.(34, 35) These results were confirmed by using western blot, since treatment of HEL and HL60 cells with Zalypsis induced Histone H2AX and CHK2 phosphorylation (Figure 4B). In addition, there was a significant increase in GADD45B levels after treatment with Zalypsis, reinforcing the DNA damage pathway as an important mechanism for the cytotoxic effect induced by this drug.

In previous studies performed in multiple myeloma (MM) by our group,(18) we had observed that although Zalypsis was able to induce cell death in all myeloma cell lines, those cells with low basal levels of p53 by western-blot (indicating a p53 wild type) were more sensitive to the drug. This situation was also confirmed in AML as all cell lines were extremely sensitive to Zalypsis irrespective of their p53 status. In fact, some of them displayed high basal levels of this protein by Western-Blot, corresponding to mutated p53 (HEL and MV4-11),(36) whereas p53 expression in the two other cell lines was low (Figure 4). Interestingly, the most sensitive cell line, (HL-60) displayed the lowest levels of p53, whereas the less sensitive (HEL) had high levels of this protein. In HL-60 cells, exposure to Zalypsis, stabilized or slightly increased the levels of this protein (Figure 4C). By contrast, HEL cell line, which has high basal levels of p53, showed no increase in the expression of the protein. The increase in p53 in HL60 levels is likely due to stabilization of the protein, as no evident changes in the mRNA levels were observed in the microarray data analysis. Interestingly, 60

Zalypsis in AML

genes in p53 canonical pathway were deregulated in HL60 cell line, whereas only 15 genes were deregulated in HEL cell line.

Discussion

Nearly 80% of patients with AML achieve Complete Remission (CR) with induction chemotherapy. However, a high proportion relapse, and eventually die of their disease.(1, 2) Recent studies have shown that Zalypsis may represent a valuable novel anticancer therapy, with strong preclinical antineoplastic efficacy and preliminary evidences of activity and a good safety profile in phase I clinical studies. In the present study, this compound was found to have a strong antileukemic activity in cell lines as well as in fresh leukemic cells from AML patients. Furthermore, Zalypsis showed a potentiation with conventional drugs used in AML treatment, supporting the future development of clinical trials using this drug in combination with daunorubicin or cytarabine among others.

Any successful therapeutic strategy in AML patients, should target not only the mature blast cells, but also the LSC compartment that is responsible of the eventual recurrence of the disease. Moreover it is also important to spare normal HSC, otherwise, severe toxicities could develop, especially at haematological level. To address these issues, we performed multiparametric flow cytometry experiments in both malignant and normal cells. Zalypsis showed a high antileukemic activity in all the studied AML samples, and this included the CD34+CD38- blast cells that had a similar sensitivity to Zalypsis as that observed in more mature blast cell populations. These observations suggest that Zalypsis targets not only the mature but also the immature blast cell populations, where leukemic stem cells are thought to be found. Interestingly, normal HSC were almost unaffected under the same conditions, which indicates that haematological toxicity would be reversible, due to the specific action of Zalypsis on the leukemic cells.

The mechanism of action of Zalypsis in AML was found to be multifactorial, and involves a strong apoptotic response. The apoptosis was detected by both Annexin/Propidium Iodide staining and DNA laddering and indirectly by the loss of mitochondrial membrane potential observed in AML cells. Apoptosis was caspase-dependent as cleavage of procaspase 8, 9 and 3 as well as PARP were detected, but caspase-independent pathways such as the release of AIF from the mitochondria could also play a role in Zalypsis induced cell death.

Zalypsis in AML

Microarray data interpretation led to the identification of DNA damage as a potential important player of the mechanism of action of Zalypsis. The gene expression profiling identified several genes implicated in MRN and BRCA1 pathways, (RAD51, RAD54L, BRCA1, BRCA2 and BARD1) whose levels were downregulated, in addition to other genes also implicated in DNA double strand break detection and repair such as MSH6 and MLH1. Western blotting studies confirmed this mechanism as Zalypsis up-regulated the levels of pH2AX, a surrogate marker of DSB as well as pCHK2, both substrates of ATM. GADD45B, another marker of DNA damage also showed higher levels. A large number of genes implicated in fundamental cellular processes such as transcription or DNA replication were also deregulated, pointing out that Zalypsis provokes DNA damage. DNA damage and error-prone repair mechanisms have been implicated in leukemia, causing genomic instability,(37-39) and thus, can be targeted by drugs inducing additional DNA damage or inhibiting DNA repair pathways.(40) Importantly, one of the principal routes involved in the DDR is the p53 pathway. In cells with high p53 basal levels, and therefore, nonfunctional p53, Zalypsis was still able to trigger DDR, as indicated by its action on pH2AX and pCHK2. Consequently, it seems that p53-independent routes can be activated by Zalypsis in AML. Taking together, these findings suggest that Zalypsis provokes a DNA damage response, probably double strand breaks in the DNA and that may be the leading mechanism of action of this drug.

In conclusion, the potent and specific activity of Zalypsis in mature and immature AML blast cells through the induction of DNA damage, supports the investigation of this novel compound for the treatment of this disease in *ad hoc* clinical trials, alone and in combination with other agents.

Conflict of interest.

Enrique Colado, Teresa Paíno, Patricia Maiso, Enrique M. Ocio, Xi Chen, Stela Álvarez-Fernández, Norma C. Gutierrez, Jesús Martín-Sánchez, Juan Flores Montero, Laura San Segundo, Mercedes Garayoa, Diego Fernández-Lázaro and Maria Belén Vidriales, declare no conflict of interest.

Atanasio Pandiella and Jesús Fernando San Miguel received research funding from Pharmamar, Madrid, Spain.

Carlos M. Galmarini, Pablo Avilés and Carmen Cuevas are employees of Pharmamar, Madrid, Spain.

Authorship statement

EC designed research, performed research, analyzed data, and wrote the paper.

TP, PM and EMO, designed research, performed research, analyzed data, and contributed to the write-up of the paper.

XC, SAF, NCG, JMS, JFM, LSS, MG, DFL, MVB performed research and analyzed data.

CG, PA and CC contributed research tools, analyzed data and contributed to the write-up of the paper.

JFS-M and AP designed research, analyzed data, and contributed to the write-up of the paper.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Ministry of Science and Innovation of Spain (BFU2006-01813/BMC and RD06/0020/ 0041). The CIC receives support from the European Community through the regional development funding program (FEDER). This work was also supported by the 'Acción Transversal del Cáncer' project, through an agreement between Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Spanish Ministry of Science and Innovation, and the Cancer Research Foundation of Salamanca University. Our group also receives support from the Junta de Castilla y León through 'Ayudas destinadas a financiar programas de actividad investigadora a realizar por grupos de investigación de excelencia de Castilla y León.

The authors would like to acknowledge Lorena González and Montserrat Martín for their excellent technical assistance.

References

1. Estey E. New drugs in acute myeloid leukemia. *Seminars in oncology* 2008 Aug; **35**(4): 439-448.
2. Jabbour EJ, Estey EJ, Kantarjian HM. Adult Acute Myeloid Leukemia. *Mayo Clin Proc* 2006 February 1, 2006; **81**(2): 247-260.

Zalypsis in AML

3. Lowenberg B. Acute myeloid leukemia: the challenge of capturing disease variety. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology* 2008; **2008**: 1-11.
4. Tallman MS, Gilliland DG, Rowe JM. Drug therapy for acute myeloid leukemia. *Blood* 2005 August 15, 2005; **106**(4): 1154-1163.
5. Warner JK, Wang JC, Hope KJ, Jin L, Dick JE. Concepts of human leukemic development. *Oncogene* 2004 Sep 20; **23**(43): 7164-7177.
6. Misaghian N, Ligresti G, Steelman LS, Bertrand FE, Basecke J, Libra M, *et al.* Targeting the leukemic stem cell: the Holy Grail of leukemia therapy. *Leukemia* 2009 Jan; **23**(1): 25-42.
7. Byrd JC, Mrozek K, Dodge RK, Carroll AJ, Edwards CG, Arthur DC, *et al.* Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood* 2002 Dec 15; **100**(13): 4325-4336.
8. Lowenberg B, Griffin JD, Tallman MS. Acute myeloid leukemia and acute promyelocytic leukemia. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology* 2003: 82-101.
9. Breems DA, Van Putten WL, Huijgens PC, Ossenkoppele GJ, Verhoef GE, Verdonck LF, *et al.* Prognostic index for adult patients with acute myeloid leukemia in first relapse. *J Clin Oncol* 2005 Mar 20; **23**(9): 1969-1978.
10. Haferlach C, Dicker F, Herholz H, Schnittger S, Kern W, Haferlach T. Mutations of the TP53 gene in acute myeloid leukemia are strongly associated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia* 2008 Aug; **22**(8): 1539-1541.
11. Fenaux P, Jonveaux P, Quiquandon I, Lai JL, Pignon JM, Loucheux-Lefebvre MH, *et al.* P53 gene mutations in acute myeloid leukemia with 17p monosomy. *Blood* 1991 Oct 1; **78**(7): 1652-1657.
12. Fenaux P, Preudhomme C, Quiquandon I, Jonveaux P, Lai JL, Vanrumbeke M, *et al.* Mutations of the P53 gene in acute myeloid leukaemia. *British journal of haematology* 1992 Feb; **80**(2): 178-183.

Zalypsis in AML

13. Merlat A, Lai JL, Sterkers Y, Demory JL, Bauters F, Preudhomme C, *et al.* Therapy-related myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia with 17p deletion. A report on 25 cases. *Leukemia* 1999 Feb; **13**(2): 250-257.
14. Stirewalt DL, Kopecky KJ, Meshinchi S, Appelbaum FR, Slovak ML, Willman CL, *et al.* FLT3, RAS, and TP53 mutations in elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2001 Jun 1; **97**(11): 3589-3595.
15. McCubrey JA, Abrams SL, Ligresti G, Misaghian N, Wong EW, Steelman LS, *et al.* Involvement of p53 and Raf/MEK/ERK pathways in hematopoietic drug resistance. *Leukemia* 2008 Nov; **22**(11): 2080-2090.
16. Molinski TF, Dalisay DS, Lievens SL, Saludes JP. Drug development from marine natural products. *Nature reviews* 2009 Jan; **8**(1): 69-85.
17. Carter NJ, Keam SJ. Trabectedin : a review of its use in the management of soft tissue sarcoma and ovarian cancer. *Drugs* 2007; **67**(15): 2257-2276.
18. Ocio EM, Maiso P, Chen X, Garayoa M, Alvarez-Fernandez S, San-Segundo L, *et al.* Zalypsis: A novel marine-derived compound with potent antimyeloma activity that reveals high sensitivity of malignant plasma cells to DNA double strand breaks. *Blood* 2008 Nov 19.
19. Leal JF, Garcia-Hernandez V, Moneo V, Domingo A, Bueren-Calabuig JA, Negri A, *et al.* Molecular pharmacology and antitumor activity of Zalypsis in several human cancer cell lines. *Biochem Pharmacol* 2009 Jul 15; **78**(2): 162-170.
20. Colado E, Alvarez-Fernandez S, Maiso P, Martin-Sanchez J, Vidriales MB, Garayoa M, *et al.* The effect of the proteasome inhibitor bortezomib on acute myeloid leukemia cells and drug resistance associated with the CD34+ immature phenotype. *Haematologica* 2008 Jan; **93**(1): 57-66.
21. Maiso P, Carvajal-Vergara X, Ocio EM, Lopez-Perez R, Mateo G, Gutierrez N, *et al.* The Histone Deacetylase Inhibitor LBH589 Is a Potent Antimyeloma Agent that Overcomes Drug Resistance. *Cancer research* 2006 June 1, 2006; **66**(11): 5781-5789.
22. Maiso P, Colado E, Ocio EM, Garayoa M, Martiñan J, Atadja P, *et al.* The synergy of panobinostat plus doxorubicin in acute myeloid leukemia suggests a role for HDAC inhibitors in the control of DNA repair. *Leukemia* 2009 Aug 10: 1-10.

Zalypsis in AML

23. Orfao A, Ortuno F, de Santiago M, Lopez A, San Miguel J. Immunophenotyping of acute leukemias and myelodysplastic syndromes. *Cytometry A* 2004 Mar; **58**(1): 62-71.
24. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 1994 Sep 1; **84**(5): 1415-1420.
25. Steensma DP, Timm M, Witzig TE. Flow cytometric methods for detection and quantification of apoptosis. *Methods Mol Med* 2003; **85**: 323-332.
26. Ozgen U, Savasan S, Buck S, Ravindranath Y. Comparison of DiOC(6)(3) uptake and annexin V labeling for quantification of apoptosis in leukemia cells and non-malignant T lymphocytes from children. *Cytometry* 2000 Feb 15; **42**(1): 74-78.
27. Guzman ML, Swiderski CF, Howard DS, Grimes B, Rossi RM, Szilvassy SJ, *et al.* Preferential induction of apoptosis for primary human leukemic stem cells. *PNAS* 2002 December, 10; **99**(25): 16220-16225.
28. Testa U, Riccioni R. Deregulation of apoptosis in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2007 Jan; **92**(1): 81-94.
29. Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Zanin C, Vayssiere JL, Petit PX, *et al.* Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. *The Journal of experimental medicine* 1995 May 1; **181**(5): 1661-1672.
30. Vandenabeele P, Vanden Berghe T, Festjens N. Caspase inhibitors promote alternative cell death pathways. *Sci STKE* 2006 Oct 24; **2006**(358): pe44.
31. Williams GH, Stoeber K. Cell cycle markers in clinical oncology. *Curr Opin Cell Biol* 2007 Dec; **19**(6): 672-679.
32. Williams RS, Williams JS, Tainer JA. Mre11-Rad50-Nbs1 is a keystone complex connecting DNA repair machinery, double-strand break signaling, and the chromatin template. *Biochem Cell Biol* 2007 Aug; **85**(4): 509-520.
33. Rupnik A, Lowndes NF, Grenon M. MRN and the race to the break. *Chromosoma* 2009 Oct 28.
34. Shrivastav M, De Haro LP, Nickoloff JA. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell research* 2008 Jan; **18**(1): 134-147.
35. Kinner A, Wu W, Staudt C, Iliakis G. Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res* 2008 Oct; **36**(17): 5678-5694.

Zalypsis in AML

36. Rizzo MG, Zepparoni A, Cristofanelli B, Scardigli R, Crescenzi M, Blandino G, *et al.* Wt-p53 action in human leukaemia cell lines corresponding to different stages of differentiation. *British journal of cancer* 1998 May; **77**(9): 1429-1438.
37. Suela J, Alvarez S, Cifuentes F, Largo C, Ferreira BI, Blesa D, *et al.* DNA profiling analysis of 100 consecutive de novo acute myeloid leukemia cases reveals patterns of genomic instability that affect all cytogenetic risk groups. *Leukemia* 2007 Jun; **21**(6): 1224-1231.
38. Sallmyr A, Fan J, Rassool FV. Genomic instability in myeloid malignancies: increased reactive oxygen species (ROS), DNA double strand breaks (DSBs) and error-prone repair. *Cancer Lett* 2008 Oct 18; **270**(1): 1-9.
39. Rassool FV, Gaymes TJ, Omidvar N, Brady N, Beurlet S, Pla M, *et al.* Reactive oxygen species, DNA damage, and error-prone repair: a model for genomic instability with progression in myeloid leukemia? *Cancer research* 2007 Sep 15; **67**(18): 8762-8771.
40. Martin SA, Lord CJ, Ashworth A. DNA repair deficiency as a therapeutic target in cancer. *Current opinion in genetics & development* 2008 Feb; **18**(1): 80-86.

Footnotes

Figure 1. Effect of Zalypsis alone and in combination with other agents on the proliferation of acute myeloid leukaemia cells. A) AML cells were plated at identical densities in 96-well dishes and incubated with different doses of Zalypsis. MTT uptake assays were performed 24 and 48 hours later. Data is represented as the mean of quadruplicates of an experiment that was repeated at least twice. (B) Zalypsis (1 nM) was combined in HEL and HL60 cells for 24 hours with different antileukemic drugs at the concentrations indicated and viability was analyzed by MTT assay. (C) Box diagrams representing the percentage of induction of apoptosis after *ex vivo* treatment with Zalypsis (10 nM) for 18 hours of: freshly isolated bone marrow cells obtained from AML patients (BC) (n=10), immature blast cells or leukemic stem cells from patients (LSC) (n=4) and normal hematopoietic stem cells from non-leukemic donors (HSC) (n=4). (D) A representative example of the apoptosis study on the immature blast cell compartment (LSC). CD34⁺ cells were gated as described under Material and Methods. The first pannel depicts the gating strategy for the identification of the immature populations with the two monoclonal antibodies CD34 and CD38. The cuantification of apoptosis induction (by Annexin-V staining) is displayed in normal HSC (second pannel) and LSC (third pannel).

Figure 2. Zalypsis causes apoptotic cell death in acute myeloid leukaemia cell lines. (A) Time-course of the effect of Zalypsis (10 nM) on HEL and HL60 cells with Annexin V-FITC and Propidium Iodide (B) Zalypsis provokes internucleosomal DNA fragmentation: HEL and HL60 cells were treated with Zalypsis for the indicated times and DNA was isolated and analyzed by agarose gel electrophoresis. (C) HEL and HL60 cells were treated with Zalypsis (10 nM) for the indicated times, and the expression of PARP, Caspase-3, Caspase 7, Caspase-8 and Caspase-9 proteins analyzed by Western blotting. Tubulin was used as loading control. (D) HEL and HL60 cells were treated with Zalypsis (10 nM) for different time points, and the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) was analyzed with [DiOC6(3)] by flow cytometry. (E) HEL and HL60 cells were treated with Zalypsis (10 nM) for the indicated times, and cell extracts were used for Western blotting with anti-Bcl-2, anti- Bcl-X or anti- MCL-1 antibodies.

Figure 3. Zalypsis causes cell death through the caspase dependent and independent mechanisms. (A) HL60 and HEL cells were treated for the indicated times with Zalypsis (10nM), and the subcellular distribution of AIF, Endonuclease G and cytochrome C in mitochondrial and cytosolic fractions was analyzed by Western Blotting. (B) HEL and HL60 cells were plated and pre-treated, where indicated, with Z-VAD-FMK (20 μ M) for 60 minutes. Zalypsis (10 nM) was added to the corresponding samples, and the experiment continued for 24 hours. MTT absorbance test were carried out as described.

Figure 4. Zalypsis stimulates a DNA damage response through the induction of DSBs. (A) Venn diagram depicting the overlap of deregulated genes in HEL and HL60 cells after treatment with Zalypsis 10 nM for 16 hours. (B) HEL and HL60 cells were treated with Zalypsis 10 nM for the indicated time points, cell protein extracts were obtained of each condition and the phosphorylation of H2AX, CHK1 and CHK2 and GADD45B levels were analyzed by Western blotting. (C) Western blot showing the basal protein levels of p53 protein in the four AML cell lines tested. (D) HEL and HL60 cells were treated with Zalypsis 10 nM for the indicated time points, cell protein extracts were obtained of each condition and changes in P53 were assessed by western blot. Equal loading was confirmed with an anti-tubulin antibody.

Table 1: Baseline characteristics of AML patient samples:

	Cytogenetics	FLT3 mut	NPM1 mut	CD34 expression
AML 1*	No mitosis	WT	WT	+
AML 2	Normal	NE	NE	-
AML 3	NE	NE	NE	+
AML 4	46,XY [12]/46,XY,+8 [5]/48,idem,+mar [4]	WT	WT	+
AML 5	Normal	ITD	Mut	-
AML 6	46,XY [8]/47,XY,+8 [5]/47,idem,- 14,+mar [3]	WT	WT	+
AML 7	45,XX, -22 [17]	WT	WT	+
AML 8**	46,XX [5]/47,XX,+11 [11]	WT	WT	+
AML 9	46,XX [4]/46,XX,-10,-13,+2mar [4]	WT	NE	+
AML 10	Normal	ITD	WT	-

FLT3: fms-like tyrosine kinase 3; ITD: Internal Tandem duplication; NPM1: Nucleophosmin; NE: Not evaluated; Mut: Mutated; +: Positive; -: Negative.

* FISH studies demonstrated a loss of 5q in 84% of cells

** Molecular Studies demonstrated a JAK2 mutation

Table 2. Genes involved in the DNA damage pathway deregulated by Zalypsis in HEL and HL60 cell lines

PROBE SET	GENE NAME	HEL FOLD CHANGE	HL60 FOLD CHANGE	COMMENTS
207574_s_at	GADD45B	39.10	5,08	growth arrest and DNA-damage-inducible, beta
1565716_at	FUS	6,52	2,53	fusion (involved in t(12;16) in malignant liposarcoma)
203564_at	FANCG	-2,22	-5,75	Fanconi Anemia. Complementation Group G
202520_s_at	MLH1	-2,45	-4,68	mutL homolog
201663_s_at	SMC4	-2,95	-5,37	structural maintenance of chromosomes 4
201423_s_at	CUL4A	-3,39	-8,22	cullin 4A
210416_s_at	CHEK2	-3,50	-5,39	CHK2 checkpoint homolog (S. pombe)
218397_at	FANCL	-3,77	-5,32	Fanconi Anemia. Complementation Group L
209849_at_at	RAD51	-3,93	-3,45	RAD51Homolog(S. cerevisiae)
204531_s_at	BRCA1	-4,05	-4,01	breast cancer 1, early onset
204558_at	RAD54L	-4,35	-14,99	RAD54-like (S. cerevisiae)
208368_s_at	BRCA2	-6,45	-24,51	breast cancer 2, early onset
209259_s_at	SMC3	-7,52	-10,19	structural maintenance of chromosomes 3
205345_at	BARD1	-7,80	-4,54	BRCA1 associated RING domain 1

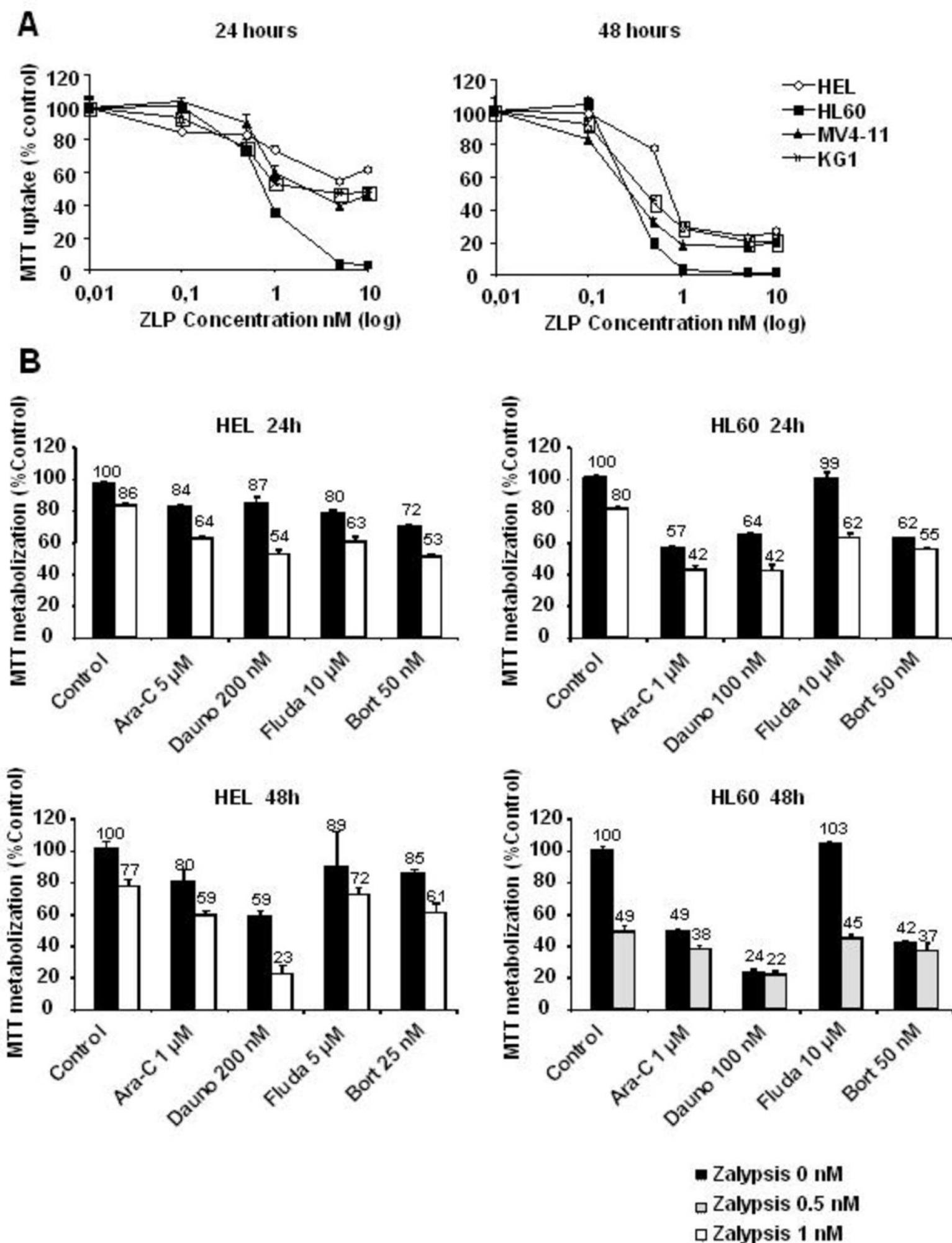
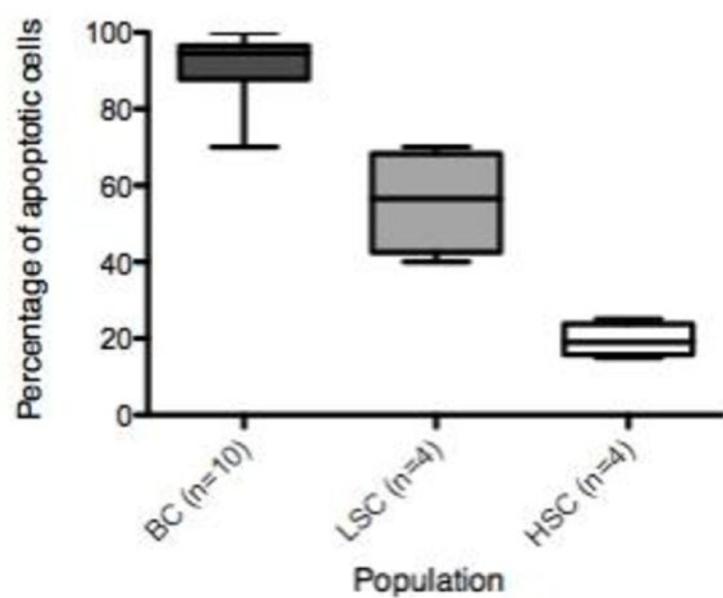
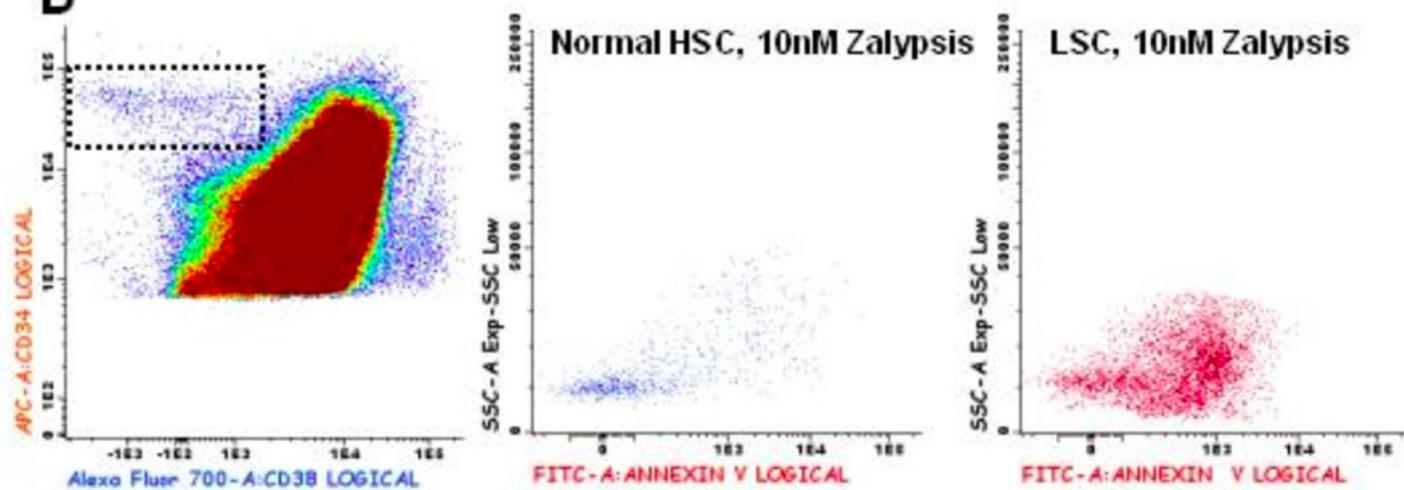


Figure 1

C**D****Figure 1**

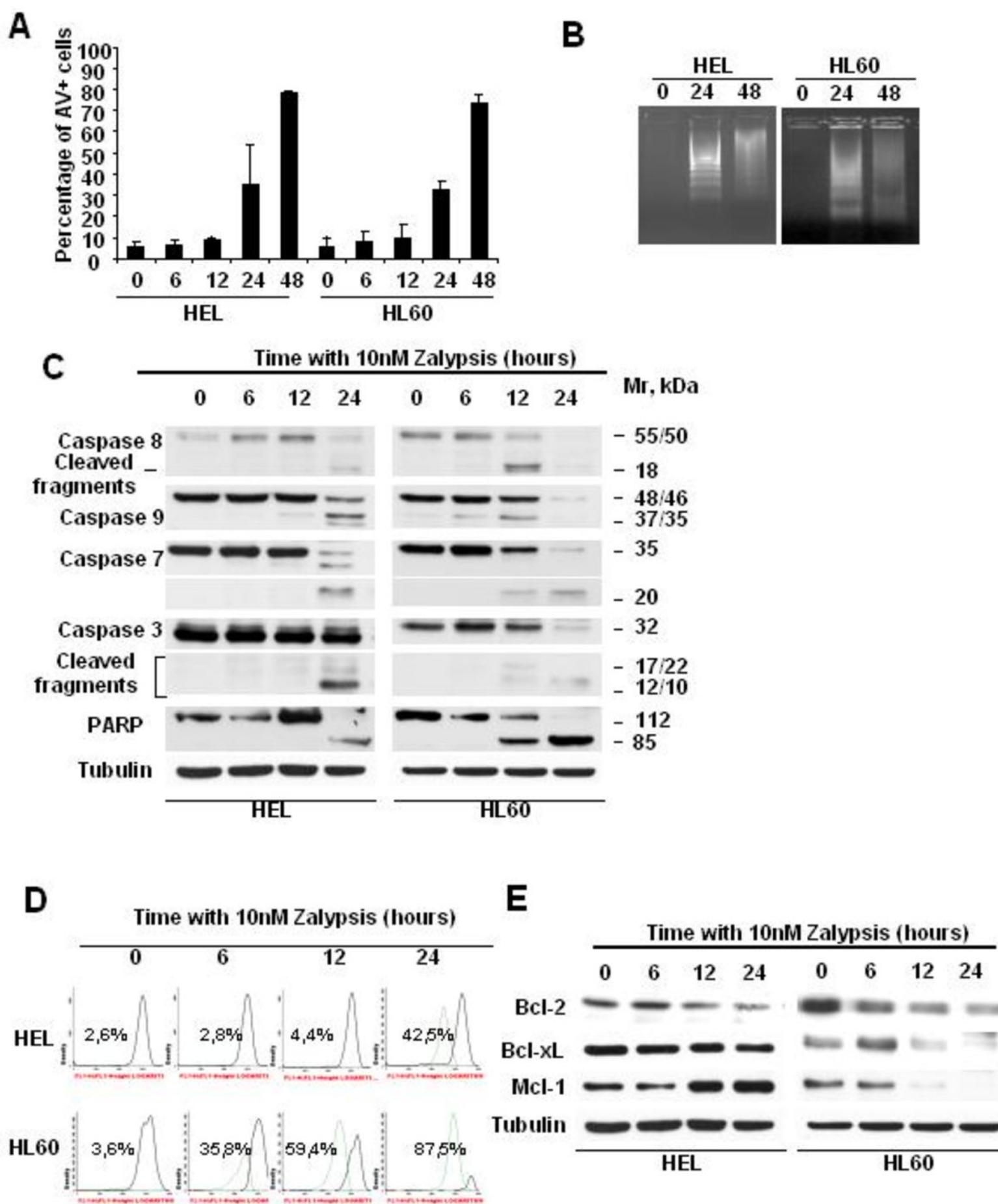
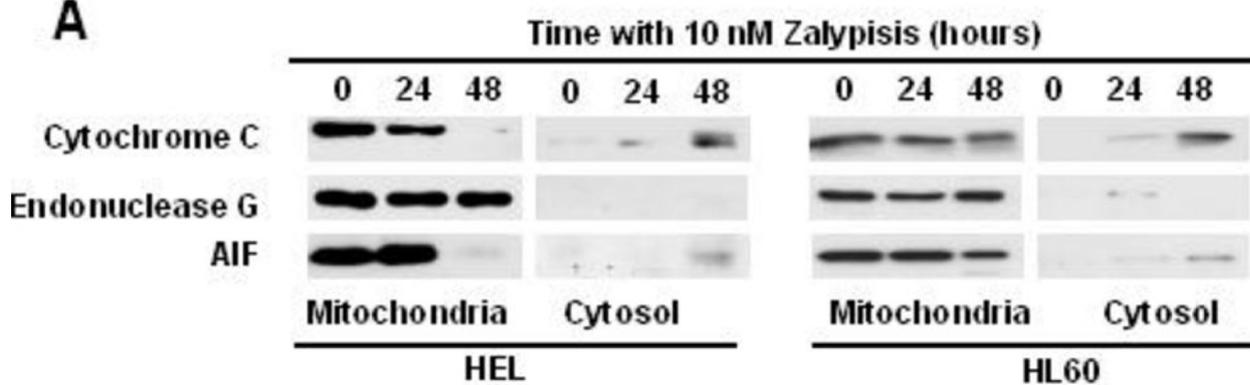
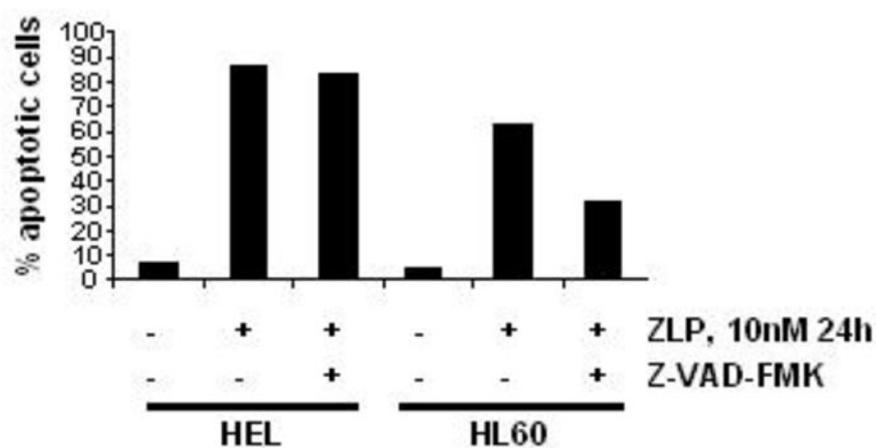


Figure 2

A**B****Figure 3**

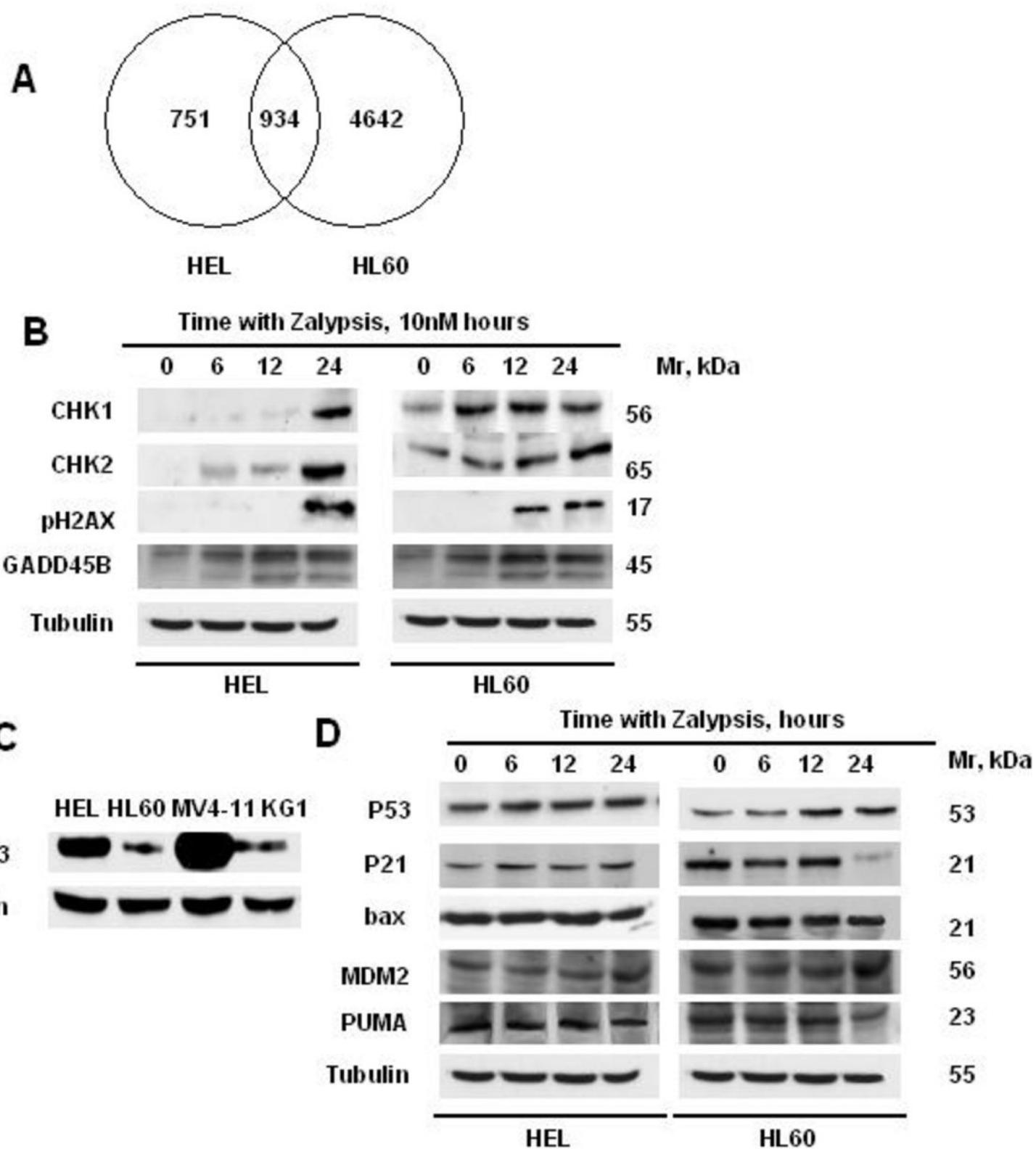


Figure 4

Discusión

Las leucemias mieloblásticas (LAM) son un conjunto heterogéneo de enfermedades clonales,^{1, 445} en las que el 50-80% de los enfermos alcanzan un estado de Remisión completa con el tratamiento de inducción, pero una proporción importante de ellos presentará recaída y morirán por causas debidas a su enfermedad. Además, existe un 20-50% de enfermos que serán resistentes al tratamiento de inducción.^{1, 2, 6, 445} Es por ello que se precisan nuevas aproximaciones al tratamiento de las Leucemias Agudas Mieloblásticas. A lo largo de los últimos 30 años, las aportaciones en el campo de la patogénia molecular de las LAM han contribuido no solo a un mejor conocimiento de las bases moleculares y patogénicas de estas enfermedades, si no también a la definición de distintos grupos de riesgo e incluso al desarrollo de tratamientos específicos.^{7, 516} Sin embargo, este progreso en general no se ha traducido en un incremento significativo en la supervivencia y, de hecho, los incrementos modestos de supervivencia que se han conseguido a lo largo de las últimas décadas han sido debidos fundamentalmente a las mejoras en el tratamiento de soporte.² Quizás la razón última de este estancamiento haya que buscarla en la escasez de nuevos fármacos, y de hecho, después de 30 años, la combinación de Daunorubicina y Ara-C sigue siendo el tratamiento de inducción estandar.^{1,9,445}

La identificación de moléculas capaces de inhibir *in vitro* e *in vivo* determinadas rutas metabólicas y procesos necesarios para el mantenimiento de las células tumorales puede contribuir al desarrollo de fármacos con una sólida base biológica para su uso. En el presente trabajo doctoral hemos querido explorar la potencial actividad de alguno de estos nuevos fármacos en las LAM a través de estudios *in vitro* en líneas celulares y *ex vivo* en células frescas obtenidas

directamente de pacientes para después intentar optimizar su uso a través de combinaciones con fármacos clásicamente utilizados en LAM y finalmente tratar de entender el mecanismo de acción antitumoral en esta patología concreta.

En el primer capítulo, presentamos los estudios sobre eficacia y mecanismo de acción de un inhibidor de proteasomas, Bortezomib en modelos de Leucemia Aguda Mieloblástica. Bortezomib es un agente capaz de inhibir la degradación de las proteínas poliubiquitinadas, entre las que se encuentran reguladores del ciclo celular como las ciclinas y las CDKs, con lo que puede regular la progresión en ciclo celular y la apoptosis.⁵¹⁷ Bortezomib es el primer inhibidor del proteasoma que ha sido utilizado en clínica para el tratamiento del mieloma múltiple,^{500,518-521} y existe una investigación activa en otras enfermedades.^{503, 522-525} En el caso de la Leucemia Mieloblástica, se han desarrollado ya tres ensayos clínicos y otro está en fase de reclutamiento de pacientes en el seno del grupo cooperativo PETHEMA. En el ensayo de MDACC, Bortezomib fue usado en monoterapia en pacientes con LAM en recaída o refractarios mostrando eficacia antileucémica en algunos casos, aunque ésta fue transitoria.⁵²⁶ Un ensayo posterior, asoció Bortezomib con una antraciclina (Doxorrubicina Liposomal) en pacientes con LAM refractaria o en recaída tras otros tratamientos, mostrando efecto antileucémico claro en 2 de 5 pacientes tratados.⁵²⁷ El ensayo con más pacientes hasta la fecha incluye 31 pacientes, 9 de ellos en recaída, con una edad media de 62 años. En este ensayo fase I/II la tasa de remisión completa fue un 61% sin ser significativamente diferente en los pacientes en recaída.⁵²⁸ En cuanto a la seguridad, presentó un perfil adecuado, sin efectos cardiovasculares ni neurológicos graves o persistentes (un paciente desarrolló taquicardia sinusal grado IV y discreta elevación de la troponina), a pesar de su combinación con Ara-C.⁵²⁹ El presente

trabajo, que sirve como base biológica para el ensayo clínico Velcaflagida (IIS-VEL-EU-070/26866138CAN2015) de tratamiento de rescate con Bortezomib y FLAG-Ida del grupo cooperativo PETHEMA, muestra la eficacia in vitro de Bortezomib frente a distintas líneas celulares de LAM, algunas de las cuáles son resistentes a distintos fármacos usados clásicamente en el tratamiento de las LAM. Además, Bortezomib tenía un claro efecto sinérgico con Doxorubicina y Citarabina. En cuanto al mecanismo de acción, Bortezomib provoca un acúmulo de células en fase G2/M del ciclo celular. Por técnicas de Western Blot se demuestra un aumento significativo de p27, que está descrito en otros modelos tumorales tras el tratamiento con Bortezomib.⁵²⁹⁻⁵³¹ Paralelamente se observa un potente efecto pro-apoptótico con procesamiento de PARP y caspasa 3 similar al obtenido en otros tipos celulares con dosis comparables de Bortezomib,^{501,530,532,533} además la incubación con un inhibidor pan caspasa como el Z-VAD-FMK inhibe completamente la muerte inducida por Bortezomib en la línea celular HEL, sugiriendo que el principal mecanismo de apoptosis es por vía caspasa-dependiente. La pérdida de potencial de membrana mitocondrial provoca un cambio en la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa, lo que permite la salida de proteínas pro-apoptóticas como AIF, cuya eficacia está aumentada por la disminución de proteínas antiapoptóticas de la familia de BCL2.⁵³⁴ Mediante técnicas de fraccionamiento celular y western blot se ha podido demostrar la salida de AIF al citosol, que puede iniciar los eventos apoptóticos, hecho no descrito previamente como parte del mecanismo de acción de Bortezomib en otros modelos de neoplasia. De esta forma, podemos concluir que Bortezomib induce muerte celular tanto por vías dependientes de caspasa como por vías independientes de caspasas. Finalmente, se ha podido estudiar el efecto

antileucémico *ex vivo* de Bortezomib en células obtenidas de médula ósea al diagnóstico de pacientes con LAM. En estos experimentos se ha podido comparar el efecto de Bortezomib y Doxorubicina y Citarabina dentro de distintas poblaciones de blastos leucémicos. Los fármacos como la Doxorubicina tienen menos efecto frente a las poblaciones blásticas más inmaduras al compararlo con las más maduras, mientras que el efecto de Bortezomib es similar en ambas poblaciones, lo que sugiere que puede vencer la resistencia a fármacos asociada con un fenotipo inmaduro de las células blásticas.^{335,535} Este hecho es importante, ya que las poblaciones que son las responsables de la recaída son las más inmaduras, por lo que Bortezomib podría convertirse en un fármaco especialmente útil a la hora de erradicar la enfermedad mínima residual. En la misma línea de evidencia, los trabajos del grupo de Craig Jordan con inhibidores de proteasomas muestran que estos fármacos provocan fundamentalmente apoptosis a las poblaciones de blastos más inmaduros o Leukemic Stem cells sin una toxicidad significativa sobre las células hematopoyéticas normales.^{320, 536} Como conclusión final, podemos señalar la investigación preclínica con Bortezomib sustenta el interés de promover ensayos clínicos que evalúen su utilidad en el tratamiento de los pacientes con LAM.

En el segundo capítulo presentamos los estudios sobre mecanismo de acción y eficacia de la combinación de Panobinostat (LBH589, Novartis) junto con Doxorubicina en un modelo de LAM. La deregulación epigenética es un evento fundamental en la patología molecular de las LAM, lo que lleva a la transcripción aberrante de genes implicados en el crecimiento celular, la proliferación, diferenciación y muerte celular.⁵³⁷ De hecho, es uno de los principales mecanismos de progresión a LAM desde Síndromes Mielodisplásicos.⁵¹⁰ Las

alteraciones en la metilación parecen ser independientes de las alteraciones citogenéticas en la progresión.⁵³⁸ En los blastos leucémicos, el balance entre Histona Deacetilasas (HDACs) e Histona Acetiltransferasas (HAT) es modificado por mecanismos dependientes de traslocaciones cromosómicas, mutaciones puntuales o cambios en la expresión de genes.^{511, 538} Estos mecanismos están íntimamente ligados con la metilación de islas CpG mediante las DNA metiltransferasas, en este momento existe notable interés en la investigación de fármacos que inhiban las DNA metiltransferasas o las HDACs como una nueva vía para el tratamiento de los pacientes con LAM.^{456, 457, 513} En este estudio hemos evaluado la eficacia de Panobinostat solo o en combinación con fármacos actualmente empleados en el tratamiento de las LAM. Panobinostat ha demostrado una gran eficacia antileucémica en líneas celulares y muestras de pacientes diagnosticados de LAM. Esta eficacia es claramente superior a la de los fármacos clásicos, dado que Panobinostat tiene una concentración inhibitoria 50 (IC50) en el rango nanomolar bajo, lo que concuerda con los resultados en otros modelos de neoplasia.^{76, 514} Panobinostat presenta una potencia superior a la descrita en otros inhibidores de HDAC como el Vorinostat, MS275, valproato, ITF2357 o TSA.⁵³⁹⁻⁵⁴⁷ Esto puede ser debido a que Panobinostat afecta no solo la acetilación de histonas si no a otras proteínas como p53, HIF-1 α y hsp90, y no solo a Histona Deacetilasas. Más importante aun, Panobinostat presenta un potente efecto sinérgico con fármacos usados convencionalmente en el tratamiento de la LAM como la Citarabina, pero especialmente con la Doxorubicina. De hecho, esta combinación se ha revelado como una de las que posee mayor efecto sinérgico de todas las investigadas en nuestro laboratorio, tanto en el estudio con líneas celulares como en el de muestras frescas de

pacientes afectos de LAM. Este hecho singular fue el motivo de centrar el estudio biológico sobre la combinación y no solo sobre Panobinostat en monoterapia. El análisis del mecanismo de acción indica que la combinación afecta varias vías implicadas en el control del ciclo celular, apoptosis y daño a DNA. Debe destacarse que la combinación afecta a un gran número de genes que no están desregulados por Panobinostat o Doxorubicina en monoterapia, lo que sugiere un efecto sinérgico de ambos fármacos a la hora de deregular distintas rutas metabólicas.

Panobinostat y Doxorubicina inducen muerte celular por vías dependientes de caspasas, observándose procesamiento de Caspasas 3, 8 y 9 y de PARP. La importancia de estas vías se ha demostrado mediante el uso de inhibidores de caspasas como el Z-VAD-FMK que inhibía la apoptosis dependiente de Panobinostat y parcialmente la inducida por la combinación, aunque no inhibía la apoptosis debida a Doxorubicina. La combinación, además provoca un aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial, que permite la liberación de proteínas pro apoptóticas como el citocromo C. Aunque el procesamiento de caspasas y la liberación de citocromo C están descritos con otros inhibidores de HDACs, el efecto de la combinación es especialmente rápido y potente, por lo que merece la pena ser reseñado. Además de los efectos observados en vías de muerte celular, los combinación del inhibidor de histona deacetilasas y doxorubicina desencadena una importante respuesta al daño al ADN (*DNA Damage Response, DDR*). Esto se demostró mediante técnicas de análisis de expresión génica y estudios de Western Blot que mostraban un claro aumento de pH2AX y la deregulación de proteínas de las vía de ATM, que está implicada en la reparación de DNA.^{271, 352, 548} Aunque clásicamente se ha asumido que las

Leucemias Agudas Mieloblásticas son un grupo de enfermedades con poca inestabilidad genética, los defectos en las vías de reparación pueden ser aprovechados como nuevas dianas terapéuticas, aumentando la apoptosis inducida por otros fármacos o directamente induciendo muerte celular por imposibilidad de progresión en ciclo celular y otros mecanismos.^{271, 538, 549-551} Como conclusión final, podemos señalar que la combinación de Panobinostat y Doxorubicina presenta una importante actividad antileucémica, con una baja toxicidad para las células normales, lo que ha servido de base biológica para el ensayo clínico PANOBIDARA que ha puesto en marcha el grupo PETHEMA.

En el tercer capítulo presentamos los estudios sobre el mecanismo de acción y eficacia de Zalypsis (Pharmamar, Madrid, España) en leucemia aguda mieloblástica. Zalypsis se ha desvelado como la molécula con el mayor efecto antileucémico estudiada en nuestro laboratorio, siendo capaz de inducir apoptosis a concentraciones en el rango nanomolar bajo en todas las líneas celulares estudiadas y mostrando efecto antileucémico en todas las muestras obtenidas de pacientes de LAM en estudios *ex vivo*. Además, Zalypsis presenta un efecto sinérgico con otros fármacos utilizados convencionalmente para el tratamiento de las LAM, lo que apoyaría el desarrollo de ensayos clínicos que evalúen el estudio de este fármaco en combinación con antraciclinas y/o citarabina.

Zalypsis mostró una gran eficacia antileucémica tanto en poblaciones blásticas más maduras como en las poblaciones más inmaduras (CD34+ CD38-), donde se encuentran las células madre leucémicas. Este efecto sobre las poblaciones más inmaduras, convierte a Zalypsis en un fármaco potencialmente útil para actuar sobre la enfermedad mínima residual. Además, el perfil deseable

de un fármaco antileucémico contemplaría que no fuese tóxico sobre las poblaciones normales, principalmente sobre células hemopoyéticas normales, ya que si no, los pacientes desarrollarían una toxicidad medular importante o incluso inaceptable. En este sentido, demostramos que Zalypsis es un fármaco idóneo ya que tiene un potente efecto sobre las células precursoras leucémicas es selectivo, y en cambio, presenta baja toxicidad sobre las poblaciones normales.

En cuanto al mecanismo de acción, Zalypsis indujo apoptosis en las líneas celulares HEL y HL60. Esta apoptosis se demostró tiempo-dependiente y mediada por activación de la vía caspasa dependiente al detectar procesamiento de las pro-caspasas 3, 8 y 9 y PARP, aunque si bien las vías fundamentales de apoptosis con este fármaco son caspasa independientes, dado que la apoptosis no fue inhibida por la acción de Z-VAD-FMK. En ese sentido, se demostró liberación de AIF (apoptosis inducing factor) al citosol tras el tratamiento con Zalypsis.

El estudio mediante arrays de expresión génica permitió identificar el daño a DNA como un importante mediador de la muerte inducida por Zalypsis en las dos líneas celulares estudiadas. Zalypsis indujo una pronunciada deregulación génica, afectando a 1685 y 5576 genes en las líneas HEL y HL60 respectivamente. Lejos de ser inespecíficos, estos cambios afectaron a 934 genes de forma común a ambas líneas celulares, lo que nos permitió identificar a un gran número de genes implicados en la detección y reparación del daño al ADN. Dentro de esos genes alterados comunmente se encuentran genes implicados en la detección de roturas de doble hebra (DSB) como los genes del complejo de Anemia de Fanconi (FANC) y BRCA1 y genes implicados en su reparación como RAD51, RAD54, BRCA2, MSH6 y MLH1. Los estudios por técnicas de western blot contribuyeron a demostrar el daño al DNA, al detectar un incremento de la fosforilación de la

histona H2AX y de CHK2. Estas proteínas son fosforiladas por ATM en respuesta a señales de daño al ADN.^{341,552}

El daño al ADN y los mecanismo de reparación con tendencia al error han sido implicados en la patogénesis de las leucemias agudas mieloblásticas ya que causan inestabilidad genómica, que es un hecho frecuente en las LAM.^{530,533,534} De este modo, agentes que induzcan directamente daño al ADN o inhiban las vías de reparación pueden ser útiles, ya que provocarían un daño al ADN irreparable y la célula entraría en apoptosis.³⁴⁷ Este principio se ha demostrado ya a nivel clínico en varias enfermedades neoplásicas.^{363,550,553}

Como conclusión final, podemos decir que Zalypsis, debido a su selectivo potente efecto antileucémico, principalmente mediante una acción de daño al ADN, y a su sinergismo con otros fármacos utilizados habitualmente en el tratamiento de las LAM, es un buen candidato para ser evaluado en ensayos clínicos.

Conclusiones

1- Con respecto al conocimiento de la eficacia *in vitro* y *ex vivo* de fármacos convencionales usados en LMA:

El estudio sistematizado en líneas celulares y muestras de pacientes ha establecido un patrón de sensibilidad *in vitro* y *ex vivo* de los fármacos convencionalmente utilizados en el tratamiento de las LAM (antraciclinas, Citarabina y Fludarabina).

2- Con respecto a la eficacia y mecanismo de acción de tres nuevas moléculas en leucemias mieloblásticas:

- a- Es estudio preclínico de los tres nuevos fármacos (Bortezomib, Panobinostat y Zalypsis) ha permitido sentar las bases para el desarrollo de ensayos clínicos que evalúen su efectividad en el tratamiento de enfermos con leucemias agudas mieloblásticas dado su efecto potente efecto antileucémico y su sinergismo con fármacos convencionales.
- b- Bortezomib, Panobinostat y Zalypsis presentan una acción selectiva frente a los blastos leucemicos ya que su efecto citotóxico sobre las poblaciones celulares normales, incluyendo precursores hematopoyéticos normales es mucho menor, lo que hablaría a favor de una amplia ventana terapéutica de perfil de toxicidad.
- c- El mecanismo de acción de cada uno de los nuevos fármacos incluía una profunda respuesta apoptótica, pero en ellos encontramos diferencias. Mientras que el mecanismo fundamental de la apoptosis inducida por Bortezomib son las

vías dependientes de caspasas y alteración en el ciclo celular; la combinación de Panobinostat y Doxorubicina induce apoptosis por vías dependientes de caspasas, pero el mecanismo fundamental de su efecto parece ser una respuesta de daño al ADN. Zalypsis, en cambio, ejerce su efecto por vías independientes de caspasa, fundamentalmente a través de daño directo al ADN.

Bibliografía

1. Estey E, Dohner H. Acute myeloid leukaemia. *The Lancet* 2006;368:1894-907.
2. Jabbour EJ, Estey EJ, Kantarjian HM. Adult Acute Myeloid Leukemia. *Mayo Clin Proc* 2006;81:247-60.
3. Craig CM, Schiller GJ. Acute myeloid leukemia in the elderly: conventional and novel treatment approaches. *Blood reviews* 2008;22:221-34.
4. Haut A, Altman SJ, Cartwright GE, Wintrobe MM. The Influence of Chemotherapy on Survival in Acute Leukemia. *Blood* 1955;10:875-95.
5. Freireich EJ, Gehan EA, Sulman D, Boggs DR, Frei E, 3rd. The effect of chemotherapy on acute leukemia in the human. *Journal of chronic diseases* 1961;14:593-608.
6. Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ, et al. Revised Recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol* 2003;21:4642-9.
7. Tallman MS, Gilliland DG, Rowe JM. Drug therapy for acute myeloid leukemia. *Blood* 2005;106:1154-63.
8. Rai KR, Holland JF, Glidewell OJ, et al. Treatment of acute myelocytic leukemia: a study by cancer and leukemia group B. *Blood* 1981;58:1203-12.
9. Yates J, Wallace HJ, Ellison R, Holland J. Cytosine arabinoside (NSC-63878) and daunorubicin (NSC-83142) therapy in acute nonlymphocytic leukemia. *Cancer Chemother Rep* 1973;57:485-8.
10. Buchner T, Hiddemann W, Wormann B, et al. Double Induction Strategy for Acute Myeloid Leukemia: The Effect of High-Dose Cytarabine With Mitoxantrone Instead of Standard-Dose Cytarabine With Daunorubicin and 6-Thioguanine: A Randomized Trial by the German AML Cooperative Group. *Blood* 1999;93:4116-24.
11. Lowenberg B, van Putten W, Theobald M, et al. Effect of Priming with Granulocyte Colony-Stimulating Factor on the Outcome of Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia. *The New England journal of medicine* 2003;349:743-52.
12. Kern W, Estey EH. High-dose cytosine arabinoside in the treatment of acute myeloid leukemia. *Cancer* 2006;107:116-24.
13. Buchner T, Hiddemann W, Berdel WE, et al. 6-Thioguanine, Cytarabine, and Daunorubicin (TAD) and High-Dose Cytarabine and Mitoxantrone (HAM) for Induction, TAD for Consolidation, and Either Prolonged Maintenance by Reduced Monthly TAD or TAD-HAM-TAD and One Course of Intensive Consolidation by Sequential HAM in Adult Patients at All Ages With De Novo Acute Myeloid Leukemia (AML): A Randomized Trial of the German AML Cooperative Group. *J Clin Oncol* 2003;21:4496-504.
14. Fopp M, Fey MF, Bacchi M, et al. Post-remission therapy of adult acute

- myeloid leukaemia: One cycle of high-dose versus standard-dose cytarabine. *Ann Oncol* 1997;8:251-7.
15. Mayer RJ, Davis RB, Schiffer CA, et al. Intensive Postremission Chemotherapy in Adults with Acute Myeloid Leukemia. *The New England journal of medicine* 1994;331:896-903.
 16. Cassileth PA, Lynch E, Hines JD, et al. Varying intensity of postremission therapy in acute myeloid leukemia. *Blood* 1992;79:1924-30.
 17. Buchner T, Urbanitz D, Hiddemann W, et al. Intensified induction and consolidation with or without maintenance chemotherapy for acute myeloid leukemia (AML): two multicenter studies of the German AML Cooperative Group. *J Clin Oncol* 1985;3:1583-9.
 18. Buchner T, Berdel WE, Schoch C, et al. Double Induction Containing Either Two Courses or One Course of High-Dose Cytarabine Plus Mitoxantrone and Postremission Therapy by Either Autologous Stem-Cell Transplantation or by Prolonged Maintenance for Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol* 2006;24:2480-9.
 19. Burnett AK, Goldstone AH, Stevens RMF, et al. Randomised comparison of addition of autologous bone-marrow transplantation to intensive chemotherapy for acute myeloid leukaemia in first remission: results of MRC AML 10 trial. *The Lancet* 1998;351:700-8.
 20. Harousseau J-L, Cahn J-Y, Pignon B, et al. Comparison of Autologous Bone Marrow Transplantation and Intensive Chemotherapy as Postremission Therapy in Adult Acute Myeloid Leukemia. *Blood* 1997;90:2978-86.
 21. Cornelissen JJ, van Putten WLJ, Verdonck LF, et al. Results of a HOVON/SAKK donor versus no-donor analysis of myeloablative HLA-identical sibling stem cell transplantation in first remission acute myeloid leukemia in young and middle-aged adults: benefits for whom? *Blood* 2007;109:3658-66.
 22. Martino R, Caballero MD, Perez Simon JA, et al. Evidence for a graft-versus-leukemia effect after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning in acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndromes. *Blood* 2002;100:2243-5.
 23. Zittoun RA, Mandelli F, Willemze R, et al. Autologous or Allogeneic Bone Marrow Transplantation Compared with Intensive Chemotherapy in Acute Myelogenous Leukemia. *The New England journal of medicine* 1995;332:217-23.
 24. Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, et al. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group study. *Blood* 2000;96:4075-83.
 25. Cassileth PA, Harrington DP, Appelbaum FR, et al. Chemotherapy Compared with Autologous or Allogeneic Bone Marrow Transplantation in the Management of Acute Myeloid Leukemia in First Remission. *The New England journal of medicine* 1998;339:1649-56.
 26. Hernandez-Boluda JC, Sierra J, Esteve J, Nomdedeu B, Montserrat E. Treatment of elderly patients with AML:

- results of an individualized approach. *Haematologica* 1998;83:34-9.
27. San Miguel JF, Vidriales MB, Lopez-Berges C, et al. Early immunophenotypical evaluation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia identifies different patient risk groups and may contribute to postinduction treatment stratification. *Blood* 2001;98:1746-51.
 28. Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nature medicine* 2004;10:789-99.
 29. Smith KA, Griffin JD. Following the cytokine signaling pathway to leukemogenesis: a chronology. *The Journal of clinical investigation* 2008;118:3564-73.
 30. Scholl C, Gilliland DG, Frohling S. Deregulation of signaling pathways in acute myeloid leukemia. *Seminars in oncology* 2008;35:336-45.
 31. Dick JE. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood* 2008;112:4793-807.
 32. Shapiro LH, Look AT. Transcriptional regulation in myeloid cell differentiation. *Curr Opin Hematol* 1995;2:3-11.
 33. Warner JK, Wang JC, Hope KJ, Jin L, Dick JE. Concepts of human leukemic development. *Oncogene* 2004;23:7164-77.
 34. Reilly JT. Pathogenesis of acute myeloid leukaemia and inv(16)(p13;q22): a paradigm for understanding leukaemogenesis? *British journal of haematology* 2005;128:18-34.
 35. Shih LY, Liang DC, Huang CF, et al. Cooperating mutations of receptor tyrosine kinases and Ras genes in childhood core-binding factor acute myeloid leukemia and a comparative analysis on paired diagnosis and relapse samples. *Leukemia* 2008;22:303-7.
 36. Greaves MF, Wiemels J. Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2003;3:639-49.
 37. Mitelman F, Johansson B, Mertens F. The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nat Rev Cancer* 2007;7:233-45.
 38. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, et al. Cytoplasmic Nucleophosmin in Acute Myelogenous Leukemia with a Normal Karyotype. *The New England journal of medicine* 2005;352:254-66.
 39. Frohling S, Schlenk RF, Breittruck J, et al. Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. *Blood* 2002;100:4372-80.
 40. Mrozek K, Marcucci G, Paschka P, Whitman SP, Bloomfield CD. Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood* 2007;109:431-48.
 41. Jonuleit T, Peschel C, Schwab R, et al. Bcr-Abl kinase promotes cell cycle entry of primary myeloid CML cells in the absence of growth factors. *British journal of haematology* 1998;100:295-303.
 42. Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, et al. Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine

- derivative. *Cancer research* 1996;56:100-4.
43. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *The New England journal of medicine* 2001;344:1031-7.
44. Drexler HG, MacLeod RA. Malignant hematopoietic cell lines: in vitro models for the study of anaplastic large-cell lymphoma. *Leukemia* 2004;18:1569-71.
45. Drexler HG, MacLeod RA, Borkhardt A, Janssen JW. Recurrent chromosomal translocations and fusion genes in leukemia-lymphoma cell lines. *Leukemia* 1995;9:480-500.
46. Rangarajan A, Weinberg RA. Opinion: Comparative biology of mouse versus human cells: modelling human cancer in mice. *Nat Rev Cancer* 2003;3:952-9.
47. Rivera J, Tessarollo L. Genetic background and the dilemma of translating mouse studies to humans. *Immunity* 2008;28:1-4.
48. Hawley RG, Lieu FH, Fong AZ, Hawley TS. Versatile retroviral vectors for potential use in gene therapy. *Gene therapy* 1994;1:136-8.
49. Darley RL, Hoy TG, Baines P, Padua RA, Burnett AK. Mutant N-RAS induces erythroid lineage dysplasia in human CD34+ cells. *The Journal of experimental medicine* 1997;185:1337-47.
50. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 1994;367:645-8.
51. Bennett JM, Catovsky D, Daniel M-T, et al. Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group. *British journal of haematology* 1976;33:451-8.
52. Frohling S, Scholl C, Gilliland DG, Levine RL. Genetics of Myeloid Malignancies: Pathogenetic and Clinical Implications. *J Clin Oncol* 2005;23:6285-95.
53. Breems DA, Van Putten WL, De Greef GE, et al. Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia: a better indicator of poor prognosis than a complex karyotype. *J Clin Oncol* 2008;26:4791-7.
54. The Fourth International Workshop on Chromosomes in Leukemia: a prospective study of acute nonlymphocytic leukemia. Chicago, Illinois, U.S.A., September 2-7, 1982. *Cancer Genet Cytogenet* 1984;11:249-360.
55. Loss of the Y chromosome from normal and neoplastic bone marrows. United Kingdom Cancer Cytogenetics Group (UKCCG). *Genes Chromosomes Cancer* 1992;5:83-8.
56. Castro PD, Liang JC, Nagarajan L. Deletions of chromosome 5q13.3 and 17p loci cooperate in myeloid neoplasms. *Blood* 2000;95:2138-43.
57. Meyers S, Downing JR, Hiebert SW. Identification of AML-1 and the (8;21) translocation protein (AML-1/ETO) as sequence-specific DNA-binding proteins: the runt homology domain is required for DNA binding and protein-protein interactions. *Molecular and cellular biology* 1993;13:6336-45.
58. Ohki M. Molecular basis of the t(8;21) translocation in acute myeloid leukaemia. *Semin Cancer Biol* 1993;4:369-75.

59. Le XF, Claxton D, Kornblau S, Fan YH, Mu ZM, Chang KS. Characterization of the ETO and AML1-ETO proteins involved in 8;21 translocation in acute myelogenous leukemia. *Eur J Haematol* 1998;60:217-25.
60. Meyers S, Lenny N, Hiebert SW. The t(8;21) fusion protein interferes with AML1-B-dependent transcriptional activation. *Molecular and cellular biology* 1995;15:1974-82.
61. Okuda T, Cai Z, Yang S, et al. Expression of a knocked-in AML1-ETO leukemia gene inhibits the establishment of normal definitive hematopoiesis and directly generates dysplastic hematopoietic progenitors. *Blood* 1998;91:3134-43.
62. Castilla LH. C/EBPalpha in leukemogenesis: a matter of being in the right place with the right signals. *Cancer cell* 2008;13:289-91.
63. Okuda T, van Deursen J, Hiebert SW, Grosveld G, Downing JR. AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* 1996;84:321-30.
64. Peterson LF, Yan M, Zhang DE. The p21Waf1 pathway is involved in blocking leukemogenesis by the t(8;21) fusion protein AML1-ETO. *Blood* 2007;109:4392-8.
65. Frank RC, Sun X, Berguido FJ, Jakubowiak A, Nimer SD. The t(8;21) fusion protein, AML1/ETO, transforms NIH3T3 cells and activates AP-1. *Oncogene* 1999;18:1701-10.
66. Klampfer L, Zhang J, Zelenetz AO, Uchida H, Nimer SD. The AML1/ETO fusion protein activates transcription of BCL-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996;93:14059-64.
67. Linggi B, Muller-Tidow C, van de Locht L, et al. The t(8;21) fusion protein, AML1 ETO, specifically represses the transcription of the p14(ARF) tumor suppressor in acute myeloid leukemia. *Nature medicine* 2002;8:743-50.
68. Elsasser A, Franzen M, Kohlmann A, et al. The fusion protein AML1-ETO in acute myeloid leukemia with translocation t(8;21) induces c-jun protein expression via the proximal AP-1 site of the c-jun promoter in an indirect, JNK-dependent manner. *Oncogene* 2003;22:5646-57.
69. Muller-Tidow C, Steffen B, Cauvet T, et al. Translocation products in acute myeloid leukemia activate the Wnt signaling pathway in hematopoietic cells. *Molecular and cellular biology* 2004;24:2890-904.
70. Fazi F, Zardo G, Gelmetti V, et al. Heterochromatic gene repression of the retinoic acid pathway in acute myeloid leukemia. *Blood* 2007;109:4432-40.
71. Betts DR, Ammann RA, Hirt A, et al. The prognostic significance of cytogenetic aberrations in childhood acute myeloid leukaemia. A study of the Swiss Paediatric Oncology Group (SPOG). *Eur J Haematol* 2007;78:468-76.
72. Lange BJ, Smith FO, Feusner J, et al. Outcomes in CCG-2961, a children's oncology group phase 3 trial for untreated pediatric acute myeloid leukemia: a report from the children's oncology group. *Blood* 2008;111:1044-53.
73. Grimwade D, Walker H, Oliver F, et al. The importance of diagnostic

- cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood* 1998;92:2322-33.
74. von Neuhoff C, Reinhardt D, Sander A, et al. Prognostic impact of specific chromosomal aberrations in a large group of pediatric patients with acute myeloid leukemia treated uniformly according to trial AML-BFM 98. *J Clin Oncol*;28:2682-9.
75. Bloomfield CD, Lawrence D, Byrd JC, et al. Frequency of prolonged remission duration after high-dose cytarabine intensification in acute myeloid leukemia varies by cytogenetic subtype. *Cancer research* 1998;58:4173-9.
76. Odenike OM, Alkan S, Sher D, et al. Histone deacetylase inhibitor romidepsin has differential activity in core binding factor acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2008;14:7095-101.
77. de The H, Chomienne C, Lanotte M, Degos L, Dejean A. The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus. *Nature* 1990;347:558-61.
78. Arthur DC, Bloomfield CD. Partial deletion of the long arm of chromosome 16 and bone marrow eosinophilia in acute nonlymphocytic leukemia: a new association. *Blood* 1983;61:994-8.
79. Le Beau MM, Larson RA, Bitter MA, Vardiman JW, Golomb HM, Rowley JD. Association of an inversion of chromosome 16 with abnormal marrow eosinophils in acute myelomonocytic leukemia. A unique cytogenetic-clinicopathological association. *The New England journal of medicine* 1983;309:630-6.
80. Shurtleff SA, Meyers S, Hiebert SW, et al. Heterogeneity in CBF beta/MYH11 fusion messages encoded by the inv(16)(p13q22) and the t(16;16)(p13;q22) in acute myelogenous leukemia. *Blood* 1995;85:3695-703.
81. Liu P, Tarle SA, Hajra A, et al. Fusion between transcription factor CBF beta/PEBP2 beta and a myosin heavy chain in acute myeloid leukemia. *Science (New York, NY)* 1993;261:1041-4.
82. Heibert SW, Lutterbach B, Durst K, et al. Mechanisms of transcriptional repression by the t(8;21)-, t(12;21)-, and inv(16)-encoded fusion proteins. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 2001;48 Suppl 1:S31-4.
83. Lutterbach B, Hou Y, Durst KL, Hiebert SW. The inv(16) encodes an acute myeloid leukemia 1 transcriptional corepressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999;96:12822-7.
84. Kogan SC, Lagasse E, Atwater S, et al. The PEBP2betaMYH11 fusion created by Inv(16)(p13;q22) in myeloid leukemia impairs neutrophil maturation and contributes to granulocytic dysplasia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998;95:11863-8.
85. Castilla LH, Garrett L, Adya N, et al. The fusion gene Cbfb-MYH11 blocks myeloid differentiation and predisposes mice to acute myelomonocytic leukaemia. *Nature genetics* 1999;23:144-6.

86. Berger R, Bernheim A, Sigaux F, Daniel MT, Valensi F, Flandrin G. Acute monocytic leukemia chromosome studies. *Leukemia research* 1982;6:17-26.
87. Kaneko Y, Maseki N, Takasaki N, et al. Clinical and hematologic characteristics in acute leukemia with 11q23 translocations. *Blood* 1986;67:484-91.
88. Thirman MJ, Gill HJ, Burnett RC, et al. Rearrangement of the MLL gene in acute lymphoblastic and acute myeloid leukemias with 11q23 chromosomal translocations. *The New England journal of medicine* 1993;329:909-14.
89. Bernard OA, Berger R. Molecular basis of 11q23 rearrangements in hematopoietic malignant proliferations. *Genes Chromosomes Cancer* 1995;13:75-85.
90. Shih LY, Liang DC, Fu JF, et al. Characterization of fusion partner genes in 114 patients with de novo acute myeloid leukemia and MLL rearrangement. *Leukemia* 2006;20:218-23.
91. Schoch C, Schnittger S, Klaus M, Kern W, Hiddemann W, Haferlach T. AML with 11q23/MLL abnormalities as defined by the WHO classification: incidence, partner chromosomes, FAB subtype, age distribution, and prognostic impact in an unselected series of 1897 cytogenetically analyzed AML cases. *Blood* 2003;102:2395-402.
92. Zeleznik-Le NJ, Harden AM, Rowley JD. 11q23 translocations split the "AT-hook" cruciform DNA-binding region and the transcriptional repression domain from the activation domain of the mixed-lineage leukemia (MLL) gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994;91:10610-4.
93. Morishita K, Parganas E, Williams CL, et al. Activation of EVI1 gene expression in human acute myelogenous leukemias by translocations spanning 300-400 kilobases on chromosome band 3q26. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992;89:3937-41.
94. Russell M, List A, Greenberg P, et al. Expression of EVI1 in myelodysplastic syndromes and other hematologic malignancies without 3q26 translocations. *Blood* 1994;84:1243-8.
95. Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Erpelinck C, van Putten WL, et al. High EVI1 expression predicts poor survival in acute myeloid leukemia: a study of 319 de novo AML patients. *Blood* 2003;101:837-45.
96. Langabeer SE, Rogers JR, Harrison G, et al. EVI1 expression in acute myeloid leukaemia. *British journal of haematology* 2001;112:208-11.
97. Sood R, Talwar-Trikha A, Chakrabarti SR, Nucifora G. MDS1/EVI1 enhances TGF-beta1 signaling and strengthens its growth-inhibitory effect but the leukemia-associated fusion protein AML1/MDS1/EVI1, product of the t(3;21), abrogates growth-inhibition in response to TGF-beta1. *Leukemia* 1999;13:348-57.
98. Small D, Levenstein M, Kim E, et al. STK-1, the human homolog of Flk-2/Flt-3, is selectively expressed in CD34+ human bone marrow cells and is involved in the proliferation of early progenitor/stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994;91:459-63.

99. Small D. Targeting FLT3 for the treatment of leukemia. *Seminars in hematology* 2008;45:S17-21.
100. Nakao M, Yokota S, Iwai T, et al. Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1996;10:1911-8.
101. Thiede C, Steudel C, Mohr B, et al. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood* 2002;99:4326-35.
102. Reindl C, Bagrintseva K, Vempati S, et al. Point mutations in the juxtamembrane domain of FLT3 define a new class of activating mutations in AML. *Blood* 2006;107:3700-7.
103. Zheng R, Levis M, Piloto O, et al. FLT3 ligand causes autocrine signaling in acute myeloid leukemia cells. *Blood* 2004;103:267-74.
104. Griffith J, Black J, Faerman C, et al. The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain. *Molecular cell* 2004;13:169-78.
105. Mizuki M, Fenski R, Halfter H, et al. Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways. *Blood* 2000;96:3907-14.
106. Mizuki M, Schwable J, Steur C, et al. Suppression of myeloid transcription factors and induction of STAT response genes by AML-specific Flt3 mutations. *Blood* 2003;101:3164-73.
107. Choudhary C, Muller-Tidow C, Berdel WE, Serve H. Signal transduction of oncogenic Flt3. *International journal of hematology* 2005;82:93-9.
108. Brandts CH, Sargin B, Rode M, et al. Constitutive activation of Akt by Flt3 internal tandem duplications is necessary for increased survival, proliferation, and myeloid transformation. *Cancer research* 2005;65:9643-50.
109. Rocnik JL, Okabe R, Yu JC, et al. Roles of tyrosine 589 and 591 in STAT5 activation and transformation mediated by FLT3-ITD. *Blood* 2006;108:1339-45.
110. Whitman SP, Archer KJ, Feng L, et al. Absence of the Wild-Type Allele Predicts Poor Prognosis in Adult de Novo Acute Myeloid Leukemia with Normal Cytogenetics and the Internal Tandem Duplication of FLT3: A Cancer and Leukemia Group B Study. *Cancer research* 2001;61:7233-9.
111. Levis M, Murphy KM, Pham R, et al. Internal tandem duplications of the FLT3 gene are present in leukemia stem cells. *Blood* 2005;106:673-80.
112. Tickenbrock L, Schwable J, Wiedehege M, et al. Flt3 tandem duplication mutations cooperate with Wnt signaling in leukemic signal transduction. *Blood* 2005;105:3699-706.
113. Kottaridis PD, Gale RE, Langabeer SE, Frew ME, Bowen DT, Linch DC. Studies of FLT3 mutations in paired presentation and relapse samples from patients with acute myeloid leukemia: implications for the role of FLT3 mutations in leukemogenesis, minimal residual disease detection, and possible therapy with FLT3 inhibitors. *Blood* 2002;100:2393-8.
114. Cloos J, Goemans BF, Hess CJ, et al. Stability and prognostic influence of FLT3 mutations in paired initial and

- relapsed AML samples. *Leukemia* 2006;20:1217-20.
115. Bacher U, Haferlach C, Kern W, Haferlach T, Schnittger S. Prognostic relevance of FLT3-TKD mutations in AML: the combination matters--an analysis of 3082 patients. *Blood* 2008;111:2527-37.
116. Kitamura Y, Hirotaka S. Kit as a human oncogenic tyrosine kinase. *Cell Mol Life Sci* 2004;61:2924-31.
117. Paschka P, Marcucci G, Ruppert AS, et al. Adverse prognostic significance of KIT mutations in adult acute myeloid leukemia with inv(16) and t(8;21): a Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol* 2006;24:3904-11.
118. Kohl TM, Schnittger S, Ellwart JW, Hiddemann W, Spiekermann K. KIT exon 8 mutations associated with core-binding factor (CBF)-acute myeloid leukemia (AML) cause hyperactivation of the receptor in response to stem cell factor. *Blood* 2005;105:3319-21.
119. Ning ZQ, Li J, Arceci RJ. Activating mutations of c-kit at codon 816 confer drug resistance in human leukemia cells. *Leukemia & lymphoma* 2001;41:513-22.
120. Ning ZQ, Li J, Arceci RJ. Signal transducer and activator of transcription 3 activation is required for Asp(816) mutant c-Kit-mediated cytokine-independent survival and proliferation in human leukemia cells. *Blood* 2001;97:3559-67.
121. Kindler T, Breitenbuecher F, Marx A, et al. Efficacy and safety of imatinib in adult patients with c-kit-positive acute myeloid leukemia. *Blood* 2004;103:3644-54.
122. Kindler T, Breitenbuecher F, Marx A, et al. Sustained complete hematologic remission after administration of the tyrosine kinase inhibitor imatinib mesylate in a patient with refractory, secondary AML. *Blood* 2003;101:2960-2.
123. Gowney JD, Clark JJ, Adelsperger J, et al. Activation mutations of human c-KIT resistant to imatinib mesylate are sensitive to the tyrosine kinase inhibitor PKC412. *Blood* 2005;106:721-4.
124. Grisendi S, Mecucci C, Falini B, Pandolfi PP. Nucleophosmin and cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6:493-505.
125. Mrozek K, Dohner H, Bloomfield CD. Influence of new molecular prognostic markers in patients with karyotypically normal acute myeloid leukemia: recent advances. *Current Opinion in Hematology* 2007;14:106-14.
126. Falini B, Bolli N, Shan J, et al. Both carboxy-terminus NES motif and mutated tryptophan(s) are crucial for aberrant nuclear export of nucleophosmin leukemic mutants in NPMc+ AML. *Blood* 2006;107:4514-23.
127. Dohner K, Schlenk RF, Habdank M, et al. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood* 2005;106:3740-6.
128. Schnittger S, Schoch C, Kern W, et al. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood* 2005;106:3733-9.
129. Hollink IH, Zwaan CM, Zimmermann M, et al. Favorable

- prognostic impact of NPM1 gene mutations in childhood acute myeloid leukemia, with emphasis on cytogenetically normal AML. *Leukemia* 2009;23:262-70.
130. Schlenk RF, Dohner K, Krauter J, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *The New England journal of medicine* 2008;358:1909-18.
131. Renneville A, Roumier C, Biggio V, et al. Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. *Leukemia* 2008;22:915-31.
132. Yang GS, Minden MD, McCulloch EA. Influence of schedule on regulated sensitivity of AML blasts to cytosine arabinoside. *Leukemia* 1993;7:1012-9.
133. Andreeff M, Jiang S, Zhang X, et al. Expression of Bcl-2-related genes in normal and AML progenitors: changes induced by chemotherapy and retinoic acid. *Leukemia* 1999;13:1881-92.
134. Ketley NJ, Allen PD, Kelsey SM, Newland AC. Modulation of idarubicin-induced apoptosis in human acute myeloid leukemia blasts by all-trans retinoic acid, 1,25(OH)₂ vitamin D₃, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1997;90:4578-87.
135. Leroy H, Roumier C, Huyghe P, Biggio V, Fenaux P, Preudhomme C. CEBPA point mutations in hematological malignancies. *Leukemia* 2005;19:329-34.
136. Koschmieder S, Halmos B, Levantini E, Tenen DG. Dysregulation of the C/EBPalpha differentiation pathway in human cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:619-28.
137. Nerlov C. C/EBPalpha mutations in acute myeloid leukaemias. *Nat Rev Cancer* 2004;4:394-400.
138. Porse BT, Bryder D, Theilgaard-Monch K, et al. Loss of C/EBP alpha cell cycle control increases myeloid progenitor proliferation and transforms the neutrophil granulocyte lineage. *The Journal of experimental medicine* 2005;202:85-96.
139. Pabst T, Eyholzer M, Haefliger S, Schardt J, Mueller BU. Somatic CEBPA mutations are a frequent second event in families with germline CEBPA mutations and familial acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2008;26:5088-93.
140. Pabst T, Mueller BU, Zhang P, et al. Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia. *Nature genetics* 2001;27:263-70.
141. Cilloni D, Carturan S, Gottardi E, et al. Down-modulation of the C/EBPalpha transcription factor in core binding factor acute myeloid leukemias. *Blood* 2003;102:2705-6.
142. Pabst T, Mueller BU, Harakawa N, et al. AML1-ETO downregulates the granulocytic differentiation factor C/EBPalpha in t(8;21) myeloid leukemia. *Nature medicine* 2001;7:444-51.
143. Marcucci G, Maharry K, Radmacher MD, et al. Prognostic significance of, and gene and microRNA expression signatures associated with, CEBPA mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with high-risk molecular features: a Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol* 2008;26:5078-87.

144. Vey N, Mozziconacci MJ, Groulet-Martinec A, et al. Identification of new classes among acute myelogenous leukaemias with normal karyotype using gene expression profiling. *Oncogene* 2004;23:9381-91.
145. Bacher U, Haferlach T, Schoch C, Kern W, Schnittger S. Implications of NRAS mutations in AML: a study of 2502 patients. *Blood* 2006;107:3847-53.
146. Zhao S, Konopleva M, Cabreira-Hansen M, et al. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase dephosphorylates BAD and promotes apoptosis in myeloid leukemias. *Leukemia* 2004;18:267-75.
147. Milella M, Konopleva M, Precupanu CM, et al. MEK blockade converts AML differentiating response to retinoids into extensive apoptosis. *Blood* 2007;109:2121-9.
148. Steelman LS, Pohnert SC, Shelton JG, Franklin RA, Bertrand FE, McCubrey JA. JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia* 2004;18:189-218.
149. Steelman LS, Abrams SL, Whelan J, et al. Contributions of the Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/mTOR and Jak/STAT pathways to leukemia. *Leukemia* 2008;22:686-707.
150. Lee JT, Jr., McCubrey JA. Targeting the Raf kinase cascade in cancer therapy--novel molecular targets and therapeutic strategies. *Expert opinion on therapeutic targets* 2002;6:659-78.
151. Blalock WL, Weinstein-Oppenheimer C, Chang F, et al. Signal transduction, cell cycle regulatory, and anti-apoptotic pathways regulated by IL-3 in hematopoietic cells: possible sites for intervention with anti-neoplastic drugs. *Leukemia* 1999;13:1109-66.
152. Martelli AM, Tazzari PL, Evangelisti C, et al. Targeting the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin module for acute myelogenous leukemia therapy: from bench to bedside. *Curr Med Chem* 2007;14:2009-23.
153. McCubrey JA, Abrams SL, Ligresti G, et al. Involvement of p53 and Raf/MEK/ERK pathways in hematopoietic drug resistance. *Leukemia* 2008;22:2080-90.
154. Matsuguchi T, Salgia R, Hallek M, et al. Shc phosphorylation in myeloid cells is regulated by granulocyte macrophage colony-stimulating factor, interleukin-3, and steel factor and is constitutively increased by p210BCR/ABL. *The Journal of biological chemistry* 1994;269:5016-21.
155. Tauchi T, Boswell HS, Leibowitz D, Broxmeyer HE. Coupling between p210bcr-abl and Shc and Grb2 adaptor proteins in hematopoietic cells permits growth factor receptor-independent link to ras activation pathway. *The Journal of experimental medicine* 1994;179:167-75.
156. Marais R, Light Y, Paterson HF, Marshall CJ. Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation. *The EMBO journal* 1995;14:3136-45.
157. Steelman LS, Bertrand FE, McCubrey JA. The complexity of PTEN: mutation, marker and potential target for therapeutic intervention. *Expert opinion on therapeutic targets* 2004;8:537-50.

158. Xu S, Robbins D, Frost J, Dang A, Lange-Carter C, Cobb MH. MEKK1 phosphorylates MEK1 and MEK2 but does not cause activation of mitogen-activated protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995;92:6808-12.
159. Derijard B, Raingeaud J, Barrett T, et al. Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science (New York, NY)* 1995;267:682-5.
160. McCubrey JA, Steelman LS, Abrams SL, et al. Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance. *Advances in enzyme regulation* 2006;46:249-79.
161. O'Neill E, Rushworth L, Baccarini M, Kolch W. Role of the kinase MST2 in suppression of apoptosis by the proto-oncogene product Raf-1. *Science (New York, NY)* 2004;306:2267-70.
162. Matallanas D, Romano D, Yee K, et al. RASSF1A elicits apoptosis through an MST2 pathway directing proapoptotic transcription by the p73 tumor suppressor protein. *Molecular cell* 2007;27:962-75.
163. Stirewalt DL, Kopecky KJ, Meshinchi S, et al. FLT3, RAS, and TP53 mutations in elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2001;97:3589-95.
164. Tyner JW, Erickson H, Deininger MW, et al. High-throughput sequencing screen reveals novel, transforming RAS mutations in myeloid leukemia patients. *Blood* 2009;113:1749-55.
165. Neubauer A, Maharry K, Mrozek K, et al. Patients with acute myeloid leukemia and RAS mutations benefit most from postremission high-dose cytarabine: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol* 2008;26:4603-9.
166. Zebisch A, Staber PB, Delavar A, et al. Two transforming C-RAF germ-line mutations identified in patients with therapy-related acute myeloid leukemia. *Cancer research* 2006;66:3401-8.
167. Kornblau SM, Womble M, Qiu YH, et al. Simultaneous activation of multiple signal transduction pathways confers poor prognosis in acute myelogenous leukemia. *Blood* 2006;108:2358-65.
168. Shelton JG, Steelman LS, Abrams SL, et al. The epidermal growth factor receptor gene family as a target for therapeutic intervention in numerous cancers: what's genetics got to do with it? *Expert opinion on therapeutic targets* 2005;9:1009-30.
169. Ricciardi MR, McQueen T, Chism D, et al. Quantitative single cell determination of ERK phosphorylation and regulation in relapsed and refractory primary acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2005;19:1543-9.
170. Krebs DL, Hilton DJ. SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2001;19:378-87.
171. Takeda K, Noguchi K, Shi W, et al. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997;94:3801-4.
172. Matsumoto A, Seki Y, Kubo M, et al. Suppression of STAT5 functions in liver, mammary glands, and T cells in cytokine-inducible SH2-containing

- protein 1 transgenic mice. *Molecular and cellular biology* 1999;19:6396-407.
173. Endo TA, Masuhara M, Yokouchi M, et al. A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* 1997;387:921-4.
174. Tanuma N, Nakamura K, Shima H, Kikuchi K. Protein-tyrosine phosphatase PTPepsilon C inhibits Jak-STAT signaling and differentiation induced by interleukin-6 and leukemia inhibitory factor in M1 leukemia cells. *The Journal of biological chemistry* 2000;275:28216-21.
175. Irie-Sasaki J, Sasaki T, Matsumoto W, et al. CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling. *Nature* 2001;409:349-54.
176. Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, et al. Stat3 as an oncogene. *Cell* 1999;98:295-303.
177. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochimica et biophysica acta* 2007;1773:1263-84.
178. Rao P, Mufson RA. A membrane proximal domain of the human interleukin-3 receptor beta c subunit that signals DNA synthesis in NIH 3T3 cells specifically binds a complex of Src and Janus family tyrosine kinases and phosphatidylinositol 3-kinase. *The Journal of biological chemistry* 1995;270:6886-93.
179. Cocco L, Follo MY, Faenza I, et al. Nuclear inositide signaling: an appraisal of phospholipase C beta 1 behavior in myelodysplastic and leukemia cells. *Advances in enzyme regulation* 2007;47:2-9.
180. Martelli AM, Cocco L, Capitani S, Miscia S, Papa S, Manzoli FA. Nuclear phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate, phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, and PTen: emerging key regulators of anti-apoptotic signaling and carcinogenesis. *Eur J Histochem* 2007;51 Suppl 1:125-31.
181. Martelli AM, Evangelist C, Billi AM, Manzoli L, Papa V, Cocco L. Intranuclear 3'-phosphoinositide metabolism and apoptosis protection in PC12 cells. *Acta Biomed* 2007;78 Suppl 1:113-9.
182. Lawlor MA, Alessi DR. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *Journal of cell science* 2001;114:2903-10.
183. Hay N. The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer. *Cancer cell* 2005;8:179-83.
184. Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM, Donner DB. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* 1999;401:82-5.
185. Conacci-Sorrell M, Zhurinsky J, Ben-Ze'ev A. The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *The Journal of clinical investigation* 2002;109:987-91.
186. Moon RT. Wnt/beta-catenin pathway. *Sci STKE* 2005;2005:cm1.
187. Moon RT, Bowerman B, Boutros M, Perrimon N. The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. *Science (New York, NY)* 2002;296:1644-6.
188. Giles RH, van Es JH, Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling

- in cancer. *Biochimica et biophysica acta* 2003;1653:1-24.
189. Simon M, Grandage VL, Linch DC, Khwaja A. Constitutive activation of the Wnt/beta-catenin signalling pathway in acute myeloid leukaemia. *Oncogene* 2005;24:2410-20.
190. Ysebaert L, Chicanne G, Demur C, et al. Expression of beta-catenin by acute myeloid leukemia cells predicts enhanced clonogenic capacities and poor prognosis. *Leukemia* 2006;20:1211-6.
191. Plass C, Oakes C, Blum W, Marcucci G. Epigenetics in acute myeloid leukemia. *Seminars in oncology* 2008;35:378-87.
192. Chong S, Whitelaw E. Epigenetic germline inheritance. *Current opinion in genetics & development* 2004;14:692-6.
193. Melki JR, Vincent PC, Clark SJ. Concurrent DNA hypermethylation of multiple genes in acute myeloid leukemia. *Cancer research* 1999;59:3730-40.
194. Toyota M, Kopecky KJ, Toyota MO, Jair KW, Willman CL, Issa JP. Methylation profiling in acute myeloid leukemia. *Blood* 2001;97:2823-9.
195. Costello JF, Fruhwald MC, Smiraglia DJ, et al. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nature genetics* 2000;24:132-8.
196. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell* 2007;128:693-705.
197. Calin GA, Croce CM. MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale. *Cancer research* 2006;66:7390-4.
198. Yendamuri S, Calin GA. The role of microRNA in human leukemia: a review. *Leukemia* 2009.
199. Gore SD, Baylin S, Sugar E, et al. Combined DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in the treatment of myeloid neoplasms. *Cancer research* 2006;66:6361-9.
200. Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol* 2006;6:93-106.
201. Taylor ST, Hickman JA, Dive C. Epigenetic determinants of resistance to etoposide regulation of Bcl-X(L) and Bax by tumor microenvironmental factors. *Journal of the National Cancer Institute* 2000;92:18-23.
202. Konopleva M, Konoplev S, Hu W, Zaritskey AY, Afanasiev BV, Andreeff M. Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of anti-apoptotic proteins. *Leukemia* 2002;16:1713-24.
203. Gally N, Anani L, Lopez A, et al. The role of platelet/endothelial cell adhesion molecule 1 (CD31) and CD38 antigens in marrow microenvironmental retention of acute myelogenous leukemia cells. *Cancer research* 2007;67:8624-32.
204. Ara T, Itoi M, Kawabata K, et al. A role of CXC chemokine ligand 12/stromal cell-derived factor-1/pre-B cell growth stimulating factor and its receptor CXCR4 in fetal and adult T cell development in vivo. *J Immunol* 2003;170:4649-55.
205. Tavor S, Petit I, Porozov S, et al. Motility, proliferation, and egress to the circulation of human AML cells are elastase dependent in NOD/SCID chimeric mice. *Blood* 2005;106:2120-7.
206. Tavor S, Petit I, Porozov S, et al. CXCR4 regulates migration and development of human acute myelogenous leukemia stem cells in

- transplanted NOD/SCID mice. *Cancer research* 2004;64:2817-24.
207. Shen W, Bendall LJ, Gottlieb DJ, Bradstock KF. The chemokine receptor CXCR4 enhances integrin-mediated in vitro adhesion and facilitates engraftment of leukemic precursor-B cells in the bone marrow. *Experimental hematology* 2001;29:1439-47.
208. Ma Q, Jones D, Springer TA. The chemokine receptor CXCR4 is required for the retention of B lineage and granulocytic precursors within the bone marrow microenvironment. *Immunity* 1999;10:463-71.
209. Tilton B, Ho L, Oberlin E, et al. Signal transduction by CXC chemokine receptor 4. Stromal cell-derived factor 1 stimulates prolonged protein kinase B and extracellular signal-regulated kinase 2 activation in T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* 2000;192:313-24.
210. Fukuda S, Broxmeyer HE, Pelus LM. Flt3 ligand and the Flt3 receptor regulate hematopoietic cell migration by modulating the SDF-1alpha(CXCL12)/CXCR4 axis. *Blood* 2005;105:3117-26.
211. Konoplev S, Rassidakis GZ, Estey E, et al. Overexpression of CXCR4 predicts adverse overall and event-free survival in patients with unmutated FLT3 acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Cancer* 2007;109:1152-6.
212. Rombouts EJ, Pavic B, Lowenberg B, Ploemacher RE. Relation between CXCR-4 expression, Flt3 mutations, and unfavorable prognosis of adult acute myeloid leukemia. *Blood* 2004;104:550-7.
213. Malumbres M, Carnero A. Cell cycle deregulation: a common motif in cancer. *Prog Cell Cycle Res* 2003;5:5-18.
214. Ekholm SV, Reed SI. Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* 2000;12:676-84.
215. Tyson JJ, Novak B. Temporal organization of the cell cycle. *Curr Biol* 2008;18:R759-R68.
216. Blagosklonny MV, Pardee AB. The restriction point of the cell cycle. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 2002;1:103-10.
217. Williams GH, Stoeber K. Cell cycle markers in clinical oncology. *Curr Opin Cell Biol* 2007;19:672-9.
218. Murray AW. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* 2004;116:221-34.
219. Golubnitschaja O. Cell cycle checkpoints: the role and evaluation for early diagnosis of senescence, cardiovascular, cancer, and neurodegenerative diseases. *Amino acids* 2007;32:359-71.
220. Musgrove EA. Cyclins: roles in mitogenic signaling and oncogenic transformation. *Growth factors (Chur, Switzerland)* 2006;24:13-9.
221. Orlando DA, Lin CY, Bernard A, et al. Global control of cell-cycle transcription by coupled CDK and network oscillators. *Nature* 2008;453:944-7.
222. Obaya AJ, Mateyak MK, Sedivy JM. Mysterious liaisons: the relationship between c-Myc and the cell cycle. *Oncogene* 1999;18:2934-41.
223. Arellano M, Moreno S. Regulation of CDK/cyclin complexes

- during the cell cycle. *Int J Biochem Cell Biol* 1997;29:559-73.
224. Adams PD. Regulation of the retinoblastoma tumor suppressor protein by cyclin/cdks. *Biochimica et biophysica acta* 2001;1471:M123-33.
225. Coqueret O. New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends in cell biology* 2003;13:65-70.
226. Hallstrom TC, Nevins JR. Balancing the decision of cell proliferation and cell fate. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 2009;8.
227. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & development* 1999;13:1501-12.
228. Malumbres M, Hunt SL, Sotillo R, et al. Driving the cell cycle to cancer. *Advances in experimental medicine and biology* 2003;532:1-11.
229. Moller MB. P27 in cell cycle control and cancer. *Leukemia & lymphoma* 2000;39:19-27.
230. Chim CS, Wong AS, Kwong YL. Epigenetic inactivation of the CIP/KIP cell-cycle control pathway in acute leukemias. *American journal of hematology* 2005;80:282-7.
231. Steinman RA. Cell cycle regulators and hematopoiesis. *Oncogene* 2002;21:3403-13.
232. Tsellou E, Troungos C, Moschovi M, et al. Hypermethylation of CpG islands in the promoter region of the p15INK4B gene in childhood acute leukaemia. *Eur J Cancer* 2005;41:584-9.
233. Wolff L, Garin MT, Koller R, et al. Hypermethylation of the Ink4b locus in murine myeloid leukemia and increased susceptibility to leukemia in p15(Ink4b)-deficient mice. *Oncogene* 2003;22:9265-74.
234. Chim CS, Wong AS, Kwong YL. Epigenetic inactivation of INK4/CDK/RB cell cycle pathway in acute leukemias. *Annals of hematology* 2003;82:738-42.
235. Christiansen DH, Andersen MK, Pedersen-Bjergaard J. Methylation of p15INK4B is common, is associated with deletion of genes on chromosome arm 7q and predicts a poor prognosis in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2003;17:1813-9.
236. Hess CJ, Errami A, Berkhof J, et al. Concurrent methylation of promoters from tumor associated genes predicts outcome in acute myeloid leukemia. *Leukemia & lymphoma* 2008;49:1132-41.
237. Grovdal M, Khan R, Aggerholm A, et al. Negative effect of DNA hypermethylation on the outcome of intensive chemotherapy in older patients with high-risk myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia following myelodysplastic syndrome. *Clin Cancer Res* 2007;13:7107-12.
238. Daskalakis M, Nguyen TT, Nguyen C, et al. Demethylation of a hypermethylated P15/INK4B gene in patients with myelodysplastic syndrome by 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine) treatment. *Blood* 2002;100:2957-64.
239. Faderl S, Kantarjian HM, Estey E, et al. The prognostic significance of p16(INK4a)/p14(ARF) locus deletion and MDM-2 protein expression in adult acute myelogenous leukemia. *Cancer* 2000;89:1976-82.
240. Morse L, Chen D, Franklin D, Xiong Y, Chen-Kiang S. Induction of cell cycle arrest and B cell terminal

- differentiation by CDK inhibitor p18(INK4c) and IL-6. *Immunity* 1997;6:47-56.
241. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000;408:307-10.
242. Gartel AL, Tyner AL. Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene. *Experimental cell research* 1999;246:280-9.
243. Coutts AS, La Thangue N. The p53 response during DNA damage: impact of transcriptional cofactors. *Biochemical Society symposium* 2006;181-9.
244. Vazquez A, Bond EE, Levine AJ, Bond GL. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nature reviews* 2008;7:979-87.
245. Pietsch EC, Sykes SM, McMahon SB, Murphy ME. The p53 family and programmed cell death. *Oncogene* 2008;27:6507-21.
246. Aylon Y, Oren M. Living with p53, dying of p53. *Cell* 2007;130:597-600.
247. Preudhomme C, Fenaux P. [p53 and hematologic malignancies]. *Pathologie-biologie* 1997;45:898-908.
248. Fenaux P, Preudhomme C, Quiquandon I, et al. Mutations of the P53 gene in acute myeloid leukaemia. *British journal of haematology* 1992;80:178-83.
249. Fenaux P, Jonveaux P, Quiquandon I, et al. P53 gene mutations in acute myeloid leukemia with 17p monosomy. *Blood* 1991;78:1652-7.
250. Haferlach C, Dicker F, Herholz H, Schnittger S, Kern W, Haferlach T. Mutations of the TP53 gene in acute myeloid leukemia are strongly associated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia* 2008;22:1539-41.
251. Christiansen DH, Andersen MK, Pedersen-Bjergaard J. Mutations with loss of heterozygosity of p53 are common in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia after exposure to alkylating agents and significantly associated with deletion or loss of 5q, a complex karyotype, and a poor prognosis. *J Clin Oncol* 2001;19:1405-13.
252. Merlat A, Lai JL, Sterkers Y, et al. Therapy-related myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia with 17p deletion. A report on 25 cases. *Leukemia* 1999;13:250-7.
253. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* 1972;26:239-57.
254. Rowan S, Fisher DE. Mechanisms of apoptotic cell death. *Leukemia* 1997;11:457-65.
255. Borner C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Molecular immunology* 2003;39:615-47.
256. Adams JM, Cory S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends in biochemical sciences* 2001;26:61-6.
257. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2002;2:277-88.
258. Kumar S. Regulation of caspase activation in apoptosis: implications in pathogenesis and treatment of disease. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 1999;26:295-303.
259. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science (New York, NY)* 1995;267:1456-62.

260. Schimmer AD. Induction of apoptosis in lymphoid and myeloid leukemia. *Current oncology reports* 2006;8:430-6.
261. Schimmer AD. Novel therapies targeting the apoptosis pathway for the treatment of acute myeloid leukemia. *Current treatment options in oncology* 2007;8:277-86.
262. Schimmer AD. Apoptosis in leukemia: from molecular pathways to targeted therapies. *Best practice & research* 2008;21:5-11.
263. Testa U, Riccioni R. Deregulation of apoptosis in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2007;92:81-94.
264. McLornan DP, McMullin MF, Johnston P, Longley DB. Molecular mechanisms of drug resistance in acute myeloid leukaemia. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* 2007;3:363-77.
265. Kim R, Tanabe K, Uchida Y, Emi M, Inoue H, Toge T. Current status of the molecular mechanisms of anticancer drug-induced apoptosis. The contribution of molecular-level analysis to cancer chemotherapy. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 2002;50:343-52.
266. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 1992;148:2207-16.
267. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 1994;84:1415-20.
268. Steensma DP, Timm M, Witzig TE. Flow cytometric methods for detection and quantification of apoptosis. *Methods Mol Med* 2003;85:323-32.
269. de Bruin EC, Medema JP. Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. *Cancer treatment reviews* 2008;34:737-49.
270. Vicencio JM, Galluzzi L, Tajeddine N, et al. Senescence, apoptosis or autophagy? When a damaged cell must decide its path--a mini-review. *Gerontology* 2008;54:92-9.
271. Ashwell S, Zabludoff S. DNA damage detection and repair pathways--recent advances with inhibitors of checkpoint kinases in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2008;14:4032-7.
272. Olson SY, Garban HJ. Regulation of apoptosis-related genes by nitric oxide in cancer. *Nitric Oxide* 2008;19:170-6.
273. Del Poeta G, Bruno A, Del Principe MI, et al. Deregulation of the mitochondrial apoptotic machinery and development of molecular targeted drugs in acute myeloid leukemia. *Current cancer drug targets* 2008;8:207-22.
274. Bernasconi P. Molecular pathways in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia: relationships and distinctions--a review. *British journal of haematology* 2008;142:695-708.
275. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
276. Britos-Bray M, Ramirez M, Cao W, et al. CBFbeta-SMMHC, expressed in M4eo acute myeloid leukemia, reduces p53 induction and slows apoptosis in

- hematopoietic cells exposed to DNA-damaging agents. *Blood* 1998;92:4344-52.
277. Adler HT, Chinery R, Wu DY, et al. Leukemic HRX fusion proteins inhibit GADD34-induced apoptosis and associate with the GADD34 and hSNF5/INI1 proteins. *Molecular and cellular biology* 1999;19:7050-60.
278. Lambert B, Buckle M. Characterisation of the interface between nucleophosmin (NPM) and p53: potential role in p53 stabilisation. *FEBS letters* 2006;580:345-50.
279. den Besten W, Kuo ML, Williams RT, Sherr CJ. Myeloid leukemia-associated nucleophosmin mutants perturb p53-dependent and independent activities of the Arf tumor suppressor protein. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 2005;4:1593-8.
280. Di Fiore PP. Playing both sides: nucleophosmin between tumor suppression and oncogenesis. *J Cell Biol* 2008;182:7-9.
281. Grummitt CG, Townsley FM, Johnson CM, Warren AJ, Bycroft M. Structural consequences of nucleophosmin mutations in acute myeloid leukemia. *The Journal of biological chemistry* 2008;283:23326-32.
282. Minami Y, Yamamoto K, Kiyoi H, Ueda R, Saito H, Naoe T. Different antiapoptotic pathways between wild-type and mutated FLT3: insights into therapeutic targets in leukemia. *Blood* 2003;102:2969-75.
283. Kim KT, Baird K, Ahn JY, et al. Pim-1 is up-regulated by constitutively activated FLT3 and plays a role in FLT3-mediated cell survival. *Blood* 2005;105:1759-67.
284. Bullinger L, Valk PJ. Gene expression profiling in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2005;23:6296-305.
285. Valk PJ, Verhaak RG, Beijen MA, et al. Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. *The New England journal of medicine* 2004;350:1617-28.
286. Bullinger L, Rucker FG, Kurz S, et al. Gene-expression profiling identifies distinct subclasses of core binding factor acute myeloid leukemia. *Blood* 2007;110:1291-300.
287. Wilson CS, Davidson GS, Martin SB, et al. Gene expression profiling of adult acute myeloid leukemia identifies novel biologic clusters for risk classification and outcome prediction. *Blood* 2006;108:685-96.
288. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001;414:105-11.
289. Herr I, Debatin KM. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood* 2001;98:2603-14.
290. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science (New York, NY)* 1998;281:1305-8.
291. Daniel PT. Dissecting the pathways to death. *Leukemia* 2000;14:2035-44.
292. Tran SE, Meinander A, Eriksson JE. Instant decisions: transcription-independent control of death-receptor-mediated apoptosis. *Trends in biochemical sciences* 2004;29:601-8.
293. Rossi D, Gaidano G. Messengers of cell death: apoptotic signaling in health and disease. *Haematologica* 2003;88:212-8.
294. Friesen C, Herr I, Krammer PH, Debatin KM. Involvement of the CD95

- (APO-1/FAS) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells. *Nature medicine* 1996;2:574-7.
295. Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *The New England journal of medicine* 1996;334:1717-25.
296. Riccioni R, Pasquini L, Mariani G, et al. TRAIL decoy receptors mediate resistance of acute myeloid leukemia cells to TRAIL. *Haematologica* 2005;90:612-24.
297. Tazzari PL, Tabellini G, Ricci F, et al. Synergistic proapoptotic activity of recombinant TRAIL plus the Akt inhibitor Perifosine in acute myelogenous leukemia cells. *Cancer research* 2008;68:9394-403.
298. Conticello C, Adamo L, Vicari L, et al. Antitumor activity of bortezomib alone and in combination with TRAIL in human acute myeloid leukemia. *Acta haematologica* 2008;120:19-30.
299. Rosato RR, Almenara JA, Coe S, Grant S. The multikinase inhibitor sorafenib potentiates TRAIL lethality in human leukemia cells in association with Mcl-1 and cFLIPL down-regulation. *Cancer research* 2007;67:9490-500.
300. Estrov Z, Thall PF, Talpaz M, et al. Caspase 2 and caspase 3 protein levels as predictors of survival in acute myelogenous leukemia. *Blood* 1998;92:3090-7.
301. Schimmer AD, Dalili S, Batey RA, Riedl SJ. Targeting XIAP for the treatment of malignancy. *Cell death and differentiation* 2006;13:179-88.
302. Schimmer AD. Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer research* 2004;64:7183-90.
303. Tamm I, Richter S, Oltersdorf D, et al. High expression levels of x-linked inhibitor of apoptosis protein and survivin correlate with poor overall survival in childhood de novo acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2004;10:3737-44.
304. Huang Y, Lu M, Wu H. Antagonizing XIAP-mediated caspase-3 inhibition. Achilles' heel of cancers? *Cancer cell* 2004;5:1-2.
305. Chawla-Sarkar M, Bae SI, Reu FJ, Jacobs BS, Lindner DJ, Borden EC. Downregulation of Bcl-2, FLIP or IAPs (XIAP and survivin) by siRNAs sensitizes resistant melanoma cells to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis. *Cell death and differentiation* 2004;11:915-23.
306. Lens SM, Wolthuis RM, Klompaker R, et al. Survivin is required for a sustained spindle checkpoint arrest in response to lack of tension. *The EMBO journal* 2003;22:2934-47.
307. Li F, Ambrosini G, Chu EY, et al. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 1998;396:580-4.
308. Carvalho A, Carmena M, Sambade C, Earnshaw WC, Wheatley SP. Survivin is required for stable checkpoint activation in taxol-treated HeLa cells. *Journal of cell science* 2003;116:2987-98.
309. Altieri DC. New wirings in the survivin networks. *Oncogene* 2008;27:6276-84.
310. Ravagnan L, Roumier T, Kroemer G. Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *Journal of cellular physiology* 2002;192:131-7.
311. Reed JC, Jurgensmeier JM, Matsuyama S. Bcl-2 family proteins and

- mitochondria. *Biochimica et biophysica acta* 1998;1366:127-37.
312. Frenzel A, Grespi F, Chmielewski W, Villunger A. Bcl2 family proteins in carcinogenesis and the treatment of cancer. *Apoptosis* 2009.
313. Reed JC. Bcl-2-family proteins and hematologic malignancies: history and future prospects. *Blood* 2008;111:3322-30.
314. Deng X, Kornblau SM, Ruvolo PP, May WS, Jr. Regulation of Bcl2 phosphorylation and potential significance for leukemic cell chemoresistance. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2001;30-7.
315. Kornblau SM, Thall PF, Estrov Z, et al. The prognostic impact of BCL2 protein expression in acute myelogenous leukemia varies with cytogenetics. *Clin Cancer Res* 1999;5:1758-66.
316. Kornblau SM, Vu HT, Ruvolo P, et al. BAX and PKC α modulate the prognostic impact of BCL2 expression in acute myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res* 2000;6:1401-9.
317. Kurinna S, Konopleva M, Palla SL, et al. Bcl2 phosphorylation and active PKC α are associated with poor survival in AML. *Leukemia* 2006;20:1316-9.
318. Del Poeta G, Venditti A, Del Principe MI, et al. Amount of spontaneous apoptosis detected by Bax/Bcl-2 ratio predicts outcome in acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 2003;101:2125-31.
319. van Stijn A, van der Pol MA, Kok A, et al. Differences between the CD34 $^{+}$ and CD34 $^{-}$ blast compartments in apoptosis resistance in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2003;88:497-508.
320. Suarez L, Vidriales MB, Garcia-Larana J, et al. CD34 $^{+}$ cells from acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndromes, and normal bone marrow display different apoptosis and drug resistance-associated phenotypes. *Clin Cancer Res* 2004;10:7599-606.
321. Decaudin D, Geley S, Hirsch T, et al. Bcl-2 and Bcl-XL antagonize the mitochondrial dysfunction preceding nuclear apoptosis induced by chemotherapeutic agents. *Cancer research* 1997;57:62-7.
322. Konopleva M, Zhao S, Hu W, et al. The anti-apoptotic genes Bcl-X(L) and Bcl-2 are over-expressed and contribute to chemoresistance of non-proliferating leukaemic CD34 $^{+}$ cells. *British journal of haematology* 2002;118:521-34.
323. Birkenkamp KU, Geugien M, Lemmink HH, Kruijer W, Vellenga E. Regulation of constitutive STAT5 phosphorylation in acute myeloid leukemia blasts. *Leukemia* 2001;15:1923-31.
324. Bagrintseva K, Geisenhof S, Kern R, et al. FLT3-ITD-TKD dual mutants associated with AML confer resistance to FLT3 PTK inhibitors and cytotoxic agents by overexpression of Bcl-x(L). *Blood* 2005;105:3679-85.
325. Yang X, Liu L, Sternberg D, et al. The FLT3 Internal tandem duplication mutation prevents apoptosis in interleukin-3-deprived BaF3 cells due to protein kinase A and ribosomal S6 kinase 1-mediated BAD phosphorylation at serine 112. *Cancer research* 2005;65:7338-47.

326. Kaufmann SH, Karp JE, Svingen PA, et al. Elevated expression of the apoptotic regulator Mcl-1 at the time of leukemic relapse. *Blood* 1998;91:991-1000.
327. Tacke F, Marini FC, 3rd, Zhao S, et al. Expression of inducible Bcl-X(S) in myeloid leukemia: compensatory upregulation of Bcl-X(L) and Bcl-2 prevents apoptosis and chemosensitization. *Cancer biology & therapy* 2004;3:340-7.
328. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell Death: Critical Control Points. *Cell* 2004;116:205-19.
329. Jia L, Srinivasula SM, Liu FT, et al. Apaf-1 protein deficiency confers resistance to cytochrome c-dependent apoptosis in human leukemic cells. *Blood* 2001;98:414-21.
330. Furukawa Y, Sutheesophon K, Wada T, et al. Methylation silencing of the Apaf-1 gene in acute leukemia. *Mol Cancer Res* 2005;3:325-34.
331. Fu WN, Bertoni F, Kelsey SM, et al. Role of DNA methylation in the suppression of Apaf-1 protein in human leukaemia. *Oncogene* 2003;22:451-5.
332. Kroemer G, Petit P, Zamzami N, Vayssiere JL, Mignotte B. The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J* 1995;9:1277-87.
333. Wilkinson JC, Wilkinson AS, Scott FL, Csomos RA, Salvesen GS, Duckett CS. Neutralization of Smac/Diablo by inhibitors of apoptosis (IAPs). A caspase-independent mechanism for apoptotic inhibition. *The Journal of biological chemistry* 2004;279:51082-90.
334. Sun XM, Bratton SB, Butterworth M, MacFarlane M, Cohen GM. Bcl-2 and Bcl-xL inhibit CD95-mediated apoptosis by preventing mitochondrial release of Smac/DIABLO and subsequent inactivation of X-linked inhibitor-of-apoptosis protein. *The Journal of biological chemistry* 2002;277:11345-51.
335. Kroemer G, Martin SJ. Caspase-independent cell death. *Nature medicine* 2005;7:25-30.
336. Cande C, Cecconi F, Dessen P, Kroemer G. Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? *Journal of cell science* 2002;115:4727-34.
337. Joza N, Susin SA, Daugas E, et al. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 2001;410:549-54.
338. Lu CX, Fan TJ, Hu GB, Cong RS. Apoptosis-inducing factor and apoptosis. *Sheng wu hua xue yu sheng wu wu li xue bao Acta biochimica et biophysica Sinica* 2003;35:881-5.
339. Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 2001;412:95-9.
340. van Loo G, Schotte P, van Gurp M, et al. Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell death and differentiation* 2001;8:1136-42.
341. Shrivastav M, De Haro LP, Nickoloff JA. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell research* 2008;18:134-47.
342. David SS, O'Shea VL, Kundu S. Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature* 2007;447:941-50.

343. Nospikel T. DNA repair in mammalian cells : Nucleotide excision repair: variations on versatility. *Cell Mol Life Sci* 2009;66:994-1009.
344. Jiricny J. The multifaceted mismatch-repair system. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:335-46.
345. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 2009;461:1071-8.
346. Lin Y, Lukacsovich T, Waldman AS. Multiple pathways for repair of DNA double-strand breaks in mammalian chromosomes. *Molecular and cellular biology* 1999;19:8353-60.
347. Williams RS, Williams JS, Tainer JA. Mre11-Rad50-Nbs1 is a keystone complex connecting DNA repair machinery, double-strand break signaling, and the chromatin template. *Biochem Cell Biol* 2007;85:509-20.
348. Borde V, Cobb J. Double functions for the Mre11 complex during DNA double-strand break repair and replication. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41:1249-53.
349. Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, et al. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science (New York, NY)* 2007;316:1160-6.
350. Taylor AM, Groom A, Byrd PJ. Ataxia-telangiectasia-like disorder (ATLD)-its clinical presentation and molecular basis. *DNA Repair (Amst)* 2004;3:1219-25.
351. Gatei M, Young D, Cerosaletti KM, et al. ATM-dependent phosphorylation of nibrin in response to radiation exposure. *Nature genetics* 2000;25:115-9.
352. Kinner A, Wu W, Staudt C, Iliakis G. Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res* 2008;36:5678-94.
353. Goldberg M, Stucki M, Falck J, et al. MDC1 is required for the intra-S-phase DNA damage checkpoint. *Nature* 2003;421:952-6.
354. Carvalho MA, Couch FJ, Monteiro AN. Functional assays for BRCA1 and BRCA2. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39:298-310.
355. Kitagawa R, Bakkenist CJ, McKinnon PJ, Kastan MB. Phosphorylation of SMC1 is a critical downstream event in the ATM-NBS1-BRCA1 pathway. *Genes & development* 2004;18:1423-38.
356. Bartek J, Bartkova J, Lukas J. DNA damage signalling guards against activated oncogenes and tumour progression. *Oncogene* 2007;26:7773-9.
357. Wang H, Guan J, Perrault AR, Wang Y, Iliakis G. Replication protein A2 phosphorylation after DNA damage by the coordinated action of ataxia telangiectasia-mutated and DNA-dependent protein kinase. *Cancer research* 2001;61:8554-63.
358. Nakanishi K, Taniguchi T, Ranganathan V, et al. Interaction of FANCD2 and NBS1 in the DNA damage response. *Nat Cell Biol* 2002;4:913-20.
359. Taniguchi T, Garcia-Higuera I, Xu B, et al. Convergence of the fanconi anemia and ataxia telangiectasia signaling pathways. *Cell* 2002;109:459-72.
360. Zhao H, Watkins JL, Piwnicka-Worms H. Disruption of the checkpoint kinase 1/cell division cycle 25A pathway abrogates ionizing radiation-induced S

- and G2 checkpoints. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2002;99:14795-800.
361. Amico D, Barbui AM, Erba E, Rambaldi A, Introna M, Golay J. Differential response of human acute myeloid leukemia cells to gemtuzumab ozogamicin in vitro: role of Chk1 and Chk2 phosphorylation and caspase 3. *Blood* 2003;101:4589-97.
362. Farmer H, McCabe N, Lord CJ, et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 2005;434:917-21.
363. Fong PC, Boss DS, Yap TA, et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *The New England journal of medicine* 2009;361:123-34.
364. Fong PC, Yap TA, Boss DS, et al. Poly(ADP)-ribose polymerase inhibition: frequent durable responses in BRCA carrier ovarian cancer correlating with platinum-free interval. *J Clin Oncol*;28:2512-9.
365. Wang Y, Cortez D, Yazdi P, Neff N, Elledge SJ, Qin J. BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes & development* 2000;14:927-39.
366. Zhong Q, Chen CF, Li S, et al. Association of BRCA1 with the hRad50-hMre11-p95 complex and the DNA damage response. *Science (New York, NY)* 1999;285:747-50.
367. Garcia MJ, Benitez J. The Fanconi anaemia/BRCA pathway and cancer susceptibility. Searching for new therapeutic targets. *Clin Transl Oncol* 2008;10:78-84.
368. Boehrer S, Ades L, Tajeddine N, et al. Suppression of the DNA damage response in acute myeloid leukemia versus myelodysplastic syndrome. *Oncogene* 2009;28:2205-18.
369. Suela J, Álvarez S, Cifuentes F, et al. DNA profiling analysis of 100 consecutive de novo acute myeloid leukemia cases reveals patterns of genomic instability that affect all cytogenetic risk groups. *Leukemia* 2007;21:1224-31.
370. Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et biophysica acta* 1976;455:152-62.
371. Kartner N, Riordan JR, Ling V. Cell surface P-glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines. *Science (New York, NY)* 1983;221:1285-8.
372. Chen CJ, Chin JE, Ueda K, et al. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the mdr1 (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* 1986;47:381-9.
373. Marie JP, Zittoun R, Sikic BI. Multidrug resistance (mdr1) gene expression in adult acute leukemias: correlations with treatment outcome and in vitro drug sensitivity. *Blood* 1991;78:586-92.
374. Szakacs G, Annereau JP, Lababidi S, et al. Predicting drug sensitivity and resistance: profiling ABC transporter genes in cancer cells. *Cancer cell* 2004;6:129-37.
375. Szakacs G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, Gottesman MM. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nature reviews* 2006;5:219-34.

376. Legrand O, Simonin G, Perrot JY, Zittoun R, Marie JP. Pgp and MRP activities using calcein-AM are prognostic factors in adult acute myeloid leukemia patients. *Blood* 1998;91:4480-8.
377. Leith CP, Kopecky KJ, Chen IM, et al. Frequency and clinical significance of the expression of the multidrug resistance proteins MDR1/P-glycoprotein, MRP1, and LRP in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group Study. *Blood* 1999;94:1086-99.
378. Leith CP, Kopecky KJ, Godwin J, et al. Acute myeloid leukemia in the elderly: assessment of multidrug resistance (MDR1) and cytogenetics distinguishes biologic subgroups with remarkably distinct responses to standard chemotherapy. A Southwest Oncology Group study. *Blood* 1997;89:3323-9.
379. Wuchter C, Leonid K, Ruppert V, et al. Clinical significance of P-glycoprotein expression and function for response to induction chemotherapy, relapse rate and overall survival in acute leukemia. *Haematologica* 2000;85:711-21.
380. Benderra Z, Faussat AM, Sayada L, et al. Breast cancer resistance protein and P-glycoprotein in 149 adult acute myeloid leukemias. *Clin Cancer Res* 2004;10:7896-902.
381. Schaich M, Soucek S, Thiede C, Ehninger G, Illmer T. MDR1 and MRP1 gene expression are independent predictors for treatment outcome in adult acute myeloid leukaemia. *British journal of haematology* 2005;128:324-32.
382. Martinez A, San Miguel JF, Valverde B, et al. Functional expression of MDR-1 in acute myeloid leukemia: correlation with the clinical-biological, immunophenotypical, and prognostic disease characteristics. *Annals of hematology* 1997;75:81-6.
383. Sievers EL, Smith FO, Woods WG, et al. Cell surface expression of the multidrug resistance P-glycoprotein (P-170) as detected by monoclonal antibody MRK-16 in pediatric acute myeloid leukemia fails to define a poor prognostic group: a report from the Childrens Cancer Group. *Leukemia* 1995;9:2042-8.
384. Suarez L, Vidriales MB, Moreno MJ, et al. Differences in anti-apoptotic and multidrug resistance phenotypes in elderly and young acute myeloid leukemia patients are related to the maturation of blast cells. *Haematologica* 2005;90:54-9.
385. Ross DD, Yang W, Abruzzo LV, et al. Atypical multidrug resistance: breast cancer resistance protein messenger RNA expression in mitoxantrone-selected cell lines. *Journal of the National Cancer Institute* 1999;91:429-33.
386. Steinbach D, Sell W, Voigt A, Hermann J, Zintl F, Sauerbrey A. BCRP gene expression is associated with a poor response to remission induction therapy in childhood acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2002;16:1443-7.
387. Damiani D, Tiribelli M, Calistri E, et al. The prognostic value of P-glycoprotein (ABCB) and breast cancer resistance protein (ABCG2) in adults with de novo acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Haematologica* 2006;91:825-8.
388. Benderra Z, Faussat AM, Sayada L, et al. MRP3, BCRP, and P-glycoprotein activities are prognostic factors in adult acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2005;11:7764-72.

389. Laupeze B, Amiot L, Drenou B, et al. High multidrug resistance protein activity in acute myeloid leukaemias is associated with poor response to chemotherapy and reduced patient survival. *British journal of haematology* 2002;116:834-8.
390. Legrand O, Simonin G, Perrot JY, Zittoun R, Marie JP. Both Pgp and MRP1 activities using calcein-AM contribute to drug resistance in AML. *Advances in experimental medicine and biology* 1999;457:161-75.
391. Borg AG, Burgess R, Green LM, Scheper RJ, Yin JA. Overexpression of lung-resistance protein and increased P-glycoprotein function in acute myeloid leukaemia cells predict a poor response to chemotherapy and reduced patient survival. *British journal of haematology* 1998;103:1083-91.
392. van der Kolk DM, de Vries EG, van Putten WJ, et al. P-glycoprotein and multidrug resistance protein activities in relation to treatment outcome in acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2000;6:3205-14.
393. Filipits M, Suchomel RW, Zochbauer S, Brunner R, Lechner K, Pirker R. Multidrug resistance-associated protein in acute myeloid leukemia: No impact on treatment outcome. *Clin Cancer Res* 1997;3:1419-25.
394. Taksin AL, Legrand O, Raffoux E, et al. High efficacy and safety profile of fractionated doses of Mylotarg as induction therapy in patients with relapsed acute myeloblastic leukemia: a prospective study of the alfa group. *Leukemia* 2007;21:66-71.
395. Walter RB, Raden BW, Hong TC, Flowers DA, Bernstein ID, Linenberger ML. Multidrug resistance protein attenuates gemtuzumab ozogamicin-induced cytotoxicity in acute myeloid leukemia cells. *Blood* 2003;102:1466-73.
396. Das-Gupta EP, Seedhouse CH, Russell NH. DNA repair mechanisms and acute myeloblastic leukemia. *Hematological oncology* 2000;18:99-110.
397. Ansari M, Krajcinovic M. Pharmacogenomics of acute leukemia. *Pharmacogenomics* 2007;8:817-34.
398. Bolufer P, Collado M, Barragan E, et al. The potential effect of gender in combination with common genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes on the risk of developing acute leukemia. *Haematologica* 2007;92:308-14.
399. de Lima M, Strom SS, Keating M, et al. Implications of potential cure in acute myelogenous leukemia: development of subsequent cancer and return to work. *Blood* 1997;90:4719-24.
400. Binaschi M, Farinosi R, Borgnetto ME, Capranico G. In vivo site specificity and human isoenzyme selectivity of two topoisomerase II-poisoning anthracyclines. *Cancer research* 2000;60:3770-6.
401. Binaschi M, Bigioni M, Cipollone A, et al. Anthracyclines: selected new developments. *Current medicinal chemistry* 2001;1:113-30.
402. Inagaki A, Nakamura T, Wakisaka G. Studies on the mechanism of action of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine as an inhibitor of DNA synthesis in human leukemic leukocytes. *Cancer research* 1969;29:2169-76.
403. Sreenivasan Y, Sarkar A, Manna SK. Mechanism of cytosine arabinoside-

- mediated apoptosis: role of Rel A (p65) dephosphorylation. *Oncogene* 2003;22:4356-69.
404. Arlin Z, Case DC, Jr., Moore J, et al. Randomized multicenter trial of cytosine arabinoside with mitoxantrone or daunorubicin in previously untreated adult patients with acute nonlymphocytic leukemia (ANLL). Lederle Cooperative Group. *Leukemia* 1990;4:177-83.
405. Bishop JF, Matthews JP, Young GA, et al. A randomized study of high-dose cytarabine in induction in acute myeloid leukemia. *Blood* 1996;87:1710-7.
406. List AF, Kopecky KJ, Willman CL, et al. Benefit of cyclosporine modulation of drug resistance in patients with poor-risk acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study. *Blood* 2001;98:3212-20.
407. Gerrard G, Payne E, Baker RJ, et al. Clinical effects and P-glycoprotein inhibition in patients with acute myeloid leukemia treated with zosuquidar trihydrochloride, daunorubicin and cytarabine. *Haematologica* 2004;89:782-90.
408. Chauncey TR, Rankin C, Anderson JE, et al. A phase I study of induction chemotherapy for older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia (AML) using mitoxantrone, etoposide, and the MDR modulator PSC 833: a southwest oncology group study 9617. *Leukemia research* 2000;24:567-74.
409. Bishop JF, Lowenthal RM, Joshua D, et al. Etoposide in acute nonlymphocytic leukemia. Australian Leukemia Study Group. *Blood* 1990;75:27-32.
410. Estey EH, Thall PF, Cortes JE, et al. Comparison of idarubicin + ara-C-, fludarabine + ara-C-, and topotecan + ara-C-based regimens in treatment of newly diagnosed acute myeloid leukemia, refractory anemia with excess blasts in transformation, or refractory anemia with excess blasts. *Blood* 2001;98:3575-83.
411. Estey EH, Thall PF, Pierce S, et al. Randomized phase II study of fludarabine + cytosine arabinoside + idarubicin +/- all-trans retinoic acid +/- granulocyte colony-stimulating factor in poor prognosis newly diagnosed acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Blood* 1999;93:2478-84.
412. Byrd JC, Mrozek K, Dodge RK, et al. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood* 2002;100:4325-36.
413. Schlenk RF, Benner A, Krauter J, et al. Individual patient data-based meta-analysis of patients aged 16 to 60 years with core binding factor acute myeloid leukemia: a survey of the German Acute Myeloid Leukemia Intergroup. *J Clin Oncol* 2004;22:3741-50.
414. Suci S, Mandelli F, de Witte T, et al. Allogeneic compared with autologous stem cell transplantation in the treatment of patients younger than 46 years with acute myeloid leukemia (AML) in first complete remission (CR1): an intention-to-treat analysis of the EORTC/GIMEMAAML-10 trial. *Blood* 2003;102:1232-40.
415. Cornelissen JJ, van Putten WL, Verdonck LF, et al. Results of a

- HOVON/SAKK donor versus no-donor analysis of myeloablative HLA-identical sibling stem cell transplantation in first remission acute myeloid leukemia in young and middle-aged adults: benefits for whom? *Blood* 2007;109:3658-66.
416. Platzbecker U, Thiede C, Freiberg-Richter J, et al. Early allogeneic blood stem cell transplantation after modified conditioning therapy during marrow aplasia: stable remission in high-risk acute myeloid leukemia. *Bone marrow transplantation* 2001;27:543-6.
417. Schmid C, Schleuning M, Ledderose G, Tischer J, Kolb HJ. Sequential regimen of chemotherapy, reduced-intensity conditioning for allogeneic stem-cell transplantation, and prophylactic donor lymphocyte transfusion in high-risk acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *J Clin Oncol* 2005;23:5675-87.
418. Valcarcel D, Martino R, Caballero D, et al. Sustained remissions of high-risk acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome after reduced-intensity conditioning allogeneic hematopoietic transplantation: chronic graft-versus-host disease is the strongest factor improving survival. *J Clin Oncol* 2008;26:577-84.
419. Schoch C, Kern W, Schnittger S, Buchner T, Hiddemann W, Haferlach T. The influence of age on prognosis of de novo acute myeloid leukemia differs according to cytogenetic subgroups. *Haematologica* 2004;89:1082-90.
420. Stone RM, O'Donnell MR, Sekeres MA. Acute myeloid leukemia. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology* 2004;98:117.
421. Tilly H, Castaigne S, Bordessoule D, et al. Low-dose cytarabine versus intensive chemotherapy in the treatment of acute nonlymphocytic leukemia in the elderly. *J Clin Oncol* 1990;8:272-9.
422. Pagano L, Fianchi L, Caira M, Rutella S, Leone G. The role of Gemtuzumab Ozogamicin in the treatment of acute myeloid leukemia patients. *Oncogene* 2007;26:3679-90.
423. Stasi R, Evangelista ML, Buccisano F, Venditti A, Amadori S. Gemtuzumab ozogamicin in the treatment of acute myeloid leukemia. *Cancer treatment reviews* 2007;In Press, Corrected Proof.
424. Chevallier P, Delaunay J, Turlure P, et al. Long-term disease-free survival after gemtuzumab, intermediate-dose cytarabine, and mitoxantrone in patients with CD33(+) primary resistant or relapsed acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2008;26:5192-7.
425. Candoni A, Martinelli G, Toffoletti E, et al. Gemtuzumab-ozogamicin in combination with fludarabine, cytarabine, idarubicin (FLAI-GO) as induction therapy in CD33-positive AML patients younger than 65 years. *Leukemia research* 2008;32:1800-8.
426. Bornhauser M, Illmer T, Oelschlaegel U, et al. Gemtuzumab ozogamicin as part of reduced-intensity conditioning for allogeneic hematopoietic cell transplantation in patients with relapsed acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2008;14:5585-93.
427. de Lima M, Champlin RE, Thall PF, et al. Phase I/II study of gemtuzumab

- ozogamicin added to fludarabine, melphalan and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for high-risk CD33 positive myeloid leukemias and myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 2008;22:258-64.
428. Borthakur G, Kantarjian H, Wang X, et al. Treatment of core-binding-factor in acute myelogenous leukemia with fludarabine, cytarabine, and granulocyte colony-stimulating factor results in improved event-free survival. *Cancer* 2008;113:3181-5.
429. Estey E, Thall P, Andreeff M, et al. Use of granulocyte colony-stimulating factor before, during, and after fludarabine plus cytarabine induction therapy of newly diagnosed acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndromes: comparison with fludarabine plus cytarabine without granulocyte colony-stimulating factor. *J Clin Oncol* 1994;12:671-8.
430. Visani G, Tosi P, Zinzani PL, et al. FLAG (fludarabine + high-dose cytarabine + G-CSF): an effective and tolerable protocol for the treatment of 'poor risk' acute myeloid leukemias. *Leukemia* 1994;8:1842-6.
431. Tosi P, Visani G, Ottaviani E, Manfori S, Zinzani PL, Tura S. Fludarabine + Ara-C + G-CSF: cytotoxic effect and induction of apoptosis on fresh acute myeloid leukemia cells. *Leukemia* 1994;8:2076-82.
432. Gandhi V, Kantarjian H, Faderl S, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of plasma clofarabine and cellular clofarabine triphosphate in patients with acute leukemias. *Clin Cancer Res* 2003;9:6335-42.
433. Kantarjian HM, Jeha S, Gandhi V, Wess M, Faderl S. Clofarabine: past, present, and future. *Leukemia & lymphoma* 2007;48:1922-30.
434. Faderl S, Ferrajoli A, Wierda W, et al. Clofarabine combinations as acute myeloid leukemia salvage therapy. *Cancer* 2008;113:2090-6.
435. Faderl S, Ravandi F, Huang X, et al. A randomized study of clofarabine versus clofarabine plus low-dose cytarabine as front-line therapy for patients aged 60 years and older with acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome. *Blood* 2008;112:1638-45.
436. Faderl S, Verstovsek S, Cortes J, et al. Clofarabine and cytarabine combination as induction therapy for acute myeloid leukemia (AML) in patients 50 years of age or older. *Blood* 2006;108:45-51.
437. Knapper S. FLT3 inhibition in acute myeloid leukaemia. *British journal of haematology* 2007;138:687-99.
438. Stone RM, DeAngelo DJ, Klimek V, et al. Patients with acute myeloid leukemia and an activating mutation in FLT3 respond to a small-molecule FLT3 tyrosine kinase inhibitor, PKC412. *Blood* 2005;105:54-60.
439. Pratz KW, Sato T, Murphy KM, Stine A, Rajkhowa T, Levis M. FLT3-mutant allelic burden and clinical status are predictive of response to FLT3 inhibitors in AML. *Blood*;115:1425-32.
440. Clark JJ, Cools J, Curley DP, et al. Variable sensitivity of FLT3 activation loop mutations to the small molecule tyrosine kinase inhibitor MLN518. *Blood* 2004;104:2867-72.

441. Piloto O, Wright M, Brown P, Kim KT, Levis M, Small D. Prolonged exposure to FLT3 inhibitors leads to resistance via activation of parallel signaling pathways. *Blood* 2007;109:1643-52.
442. Breitenbuecher F, Markova B, Kasper S, et al. A novel molecular mechanism of primary resistance to FLT3-kinase inhibitors in acute myeloid leukemia. *Blood* 2009.
443. Cools J, Mentens N, Furet P, et al. Prediction of resistance to small molecule FLT3 inhibitors: implications for molecularly targeted therapy of acute leukemia. *Cancer research* 2004;64:6385-9.
444. Ikezoe T, Nishioka C, Tasaka T, et al. The antitumor effects of sunitinib (formerly SU11248) against a variety of human hematologic malignancies: enhancement of growth inhibition via inhibition of mammalian target of rapamycin signaling. *Molecular cancer therapeutics* 2006;5:2522-30.
445. Estey E. New drugs in acute myeloid leukemia. *Seminars in oncology* 2008;35:439-48.
446. Levis M, Allebach J, Tse KF, et al. A FLT3-targeted tyrosine kinase inhibitor is cytotoxic to leukemia cells in vitro and in vivo. *Blood* 2002;99:3885-91.
447. Furukawa Y, Vu HA, Akutsu M, et al. Divergent cytotoxic effects of PKC412 in combination with conventional antileukemic agents in FLT3 mutation-positive versus -negative leukemia cell lines. *Leukemia* 2007;21:1005-14.
448. Adnane L, Trail PA, Taylor I, Wilhelm SM. Sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar), a dual-action inhibitor that targets RAF/MEK/ERK pathway in tumor cells and tyrosine kinases VEGFR/PDGFR in tumor vasculature. *Methods in enzymology* 2006;407:597-612.
449. Wilhelm SM, Carter C, Tang L, et al. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer research* 2004;64:7099-109.
450. Zhang W, Konopleva M, Shi YX, et al. Mutant FLT3: a direct target of sorafenib in acute myelogenous leukemia. *Journal of the National Cancer Institute* 2008;100:184-98.
451. Chow LQ, Eckhardt SG. Sunitinib: from rational design to clinical efficacy. *J Clin Oncol* 2007;25:884-96.
452. Kelly LM, Yu JC, Boulton CL, et al. CT53518, a novel selective FLT3 antagonist for the treatment of acute myelogenous leukemia (AML). *Cancer cell* 2002;1:421-32.
453. DeAngelo DJ, Stone RM, Heaney ML, et al. Phase I clinical results with tandutinib (MLN518), a novel FLT3 antagonist, in patients with acute myelogenous leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome: safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. *Blood* 2006;108:3674-81.
454. Silverman LR, Demakos EP, Peterson BL, et al. Randomized Controlled Trial of Azacitidine in Patients With the Myelodysplastic Syndrome: A Study of the Cancer and Leukemia Group B. *J Clin Oncol* 2002;20:2429-40.

455. Silverman LR, McKenzie DR, Peterson BL, et al. Further Analysis of Trials With Azacitidine in Patients With Myelodysplastic Syndrome: Studies 8421, 8921, and 9221 by the Cancer and Leukemia Group B. *J Clin Oncol* 2006;24:3895-903.
456. Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nature reviews* 2006;5:769-84.
457. Dokmanovic M, Clarke C, Marks PA. Histone Deacetylase Inhibitors: Overview and Perspectives. *Mol Cancer Res* 2007;5:981-9.
458. Xu WS, Parmigiani RB, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene* 2007;26:5541-52.
459. Kuendgen A, Strupp C, Aivado M, et al. Treatment of myelodysplastic syndromes with valproic acid alone or in combination with all-trans retinoic acid. *Blood* 2004;104:1266-9.
460. Sanchez-Gonzalez B, Yang H, Bueso-Ramos C, et al. Antileukemia activity of the combination of an anthracycline with a histone deacetylase inhibitor. *Blood* 2006;108:1174-82.
461. Kadia TM, Yang H, Ferrajoli A, et al. A phase I study of vorinostat in combination with idarubicin in relapsed or refractory leukaemia. *British journal of haematology*.
462. George P, Bali P, Annavarapu S, et al. Combination of the histone deacetylase inhibitor LBH589 and the hsp90 inhibitor 17-AAG is highly active against human CML-BC cells and AML cells with activating mutation of FLT-3. *Blood* 2005;105:1768-76.
463. Giles F, Fischer T, Cortes J, et al. A phase I study of intravenous LBH589, a novel cinnamic hydroxamic acid analogue histone deacetylase inhibitor, in patients with refractory hematologic malignancies. *Clin Cancer Res* 2006;12:4628-35.
464. Tavor S, Eisenbach M, Jacob-Hirsch J, et al. The CXCR4 antagonist AMD3100 impairs survival of human AML cells and induces their differentiation. *Leukemia* 2008;22:2151-518.
465. Nervi B, Ramirez P, Rettig MP, et al. Chemosensitization of AML following mobilization by the CXCR4 antagonist AMD3100. *Blood* 2008.
466. Burger JA. CXCR4 in acute myelogenous leukemia (AML): When too much attraction is bad for you. *Leukemia research* 2008.
467. Zeng Z, Samudio IJ, Munsell M, et al. Inhibition of CXCR4 with the novel RCP168 peptide overcomes stroma-mediated chemoresistance in chronic and acute leukemias. *Molecular cancer therapeutics* 2006;5:3113-21.
468. Zeng Z, Shi YX, Samudio IJ, et al. Targeting the leukemia microenvironment by CXCR4 inhibition overcomes resistance to kinase inhibitors and chemotherapy in AML. *Blood* 2008.
469. Steins MB, Padro T, Bieker R, et al. Efficacy and safety of thalidomide in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2002;99:834-9.
470. Thomas DA, Estey E, Giles FJ, et al. Single agent thalidomide in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukaemia. *British journal of haematology* 2003;123:436-41.

471. Cortes J, Kantarjian H, Albitar M, et al. A randomized trial of liposomal daunorubicin and cytarabine versus liposomal daunorubicin and topotecan with or without thalidomide as initial therapy for patients with poor prognosis acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndrome. *Cancer* 2003;97:1234-41.
472. Mesa RA, Tefferi A, Li CY, Steensma DP. Hematologic and cytogenetic response to lenalidomide monotherapy in acute myeloid leukemia arising from JAK2(V617F) positive, del(5)(q13q33) myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 2006;20:2063-4.
473. Fehniger TA, Byrd JC, Marcucci G, et al. Single-agent lenalidomide induces complete remission of acute myeloid leukemia in patients with isolated trisomy 13. *Blood* 2009;113:1002-5.
474. Marcucci G, Byrd JC, Dai G, et al. Phase I and pharmacodynamic studies of G3139, a Bcl-2 antisense oligonucleotide, in combination with chemotherapy in refractory or relapsed acute leukemia. *Blood* 2003;101:425-32.
475. Marcucci G, Stock W, Dai G, et al. Phase I study of oblimersen sodium, an antisense to Bcl-2, in untreated older patients with acute myeloid leukemia: pharmacokinetics, pharmacodynamics, and clinical activity. *J Clin Oncol* 2005;23:3404-11.
476. Moore J, Seiter K, Kolitz J, et al. A Phase II study of Bcl-2 antisense (oblimersen sodium) combined with gemtuzumab ozogamicin in older patients with acute myeloid leukemia in first relapse. *Leukemia research* 2006;30:777-83.
477. Schimmer AD, Dalili S. Targeting the IAP Family of Caspase Inhibitors as an Emerging Therapeutic Strategy. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology* 2005;215-9.
478. Plasilova M, Zivny J, Jelinek J, et al. TRAIL (Apo2L) suppresses growth of primary human leukemia and myelodysplasia progenitors. *Leukemia* 2002;16:67-73.
479. Walczak H, Bouchon A, Stahl H, Krammer PH. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand retains its apoptosis-inducing capacity on Bcl-2- or Bcl-xL-overexpressing chemotherapy-resistant tumor cells. *Cancer research* 2000;60:3051-7.
480. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 1983;65:55-63.
481. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995;184:39-51.
482. Ormerod MG. The study of apoptotic cells by flow cytometry. *Leukemia* 1998;12:1013-25.
483. Matarraz S, Lopez A, Barrena S, et al. The immunophenotype of different immature, myeloid and B-cell lineage-committed CD34+ hematopoietic cells allows discrimination between normal/reactive and myelodysplastic syndrome precursors. *Leukemia* 2008;22:1175-83.

484. Orfao A, Ortuno F, de Santiago M, Lopez A, San Miguel J. Immunophenotyping of acute leukemias and myelodysplastic syndromes. *Cytometry A* 2004;58:62-71.
485. Loken MR, van de Loosdrecht A, Ogata K, Orfao A, Wells DA. Flow cytometry in myelodysplastic syndromes: report from a working conference. *Leukemia research* 2008;32:5-17.
486. Lopez-Holgado N, Arroyo JL, Pata C, et al. Analysis of hematopoietic progenitor cells in patients with myelodysplastic syndromes according to their cytogenetic abnormalities. *Leukemia research* 2004;28:1181-7.
487. Valent P, Horny HP, Bennett JM, et al. Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference. *Leukemia research* 2007;31:727-36.
488. Vander Heiden MG, Chandel NS, Williamson EK, Schumacker PT, Thompson CB. Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* 1997;91:627-37.
489. Chen Q, Takeyama N, Brady G, Watson AJ, Dive C. Blood cells with reduced mitochondrial membrane potential and cytosolic cytochrome C can survive and maintain clonogenicity given appropriate signals to suppress apoptosis. *Blood* 1998;92:4545-53.
490. Korchak HM, Rich AM, Wilkenfeld C, Rutherford LE, Weissmann G. A carbocyanine dye, DiOC6(3), acts as a mitochondrial probe in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 1982;108:1495-501.
491. Petit PX, Lecoeur H, Zorn E, Dauguet C, Mignotte B, Gougeon ML. Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. *J Cell Biol* 1995;130:157-67.
492. Ozgen U, Savasan S, Buck S, Ravindranath Y. Comparison of DiOC(6)(3) uptake and annexin V labeling for quantification of apoptosis in leukemia cells and non-malignant T lymphocytes from children. *Cytometry* 2000;42:74-8.
493. Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, et al. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. *The Journal of experimental medicine* 1995;181:1661-72.
494. Pozarowski P, Darzynkiewicz Z. Analysis of cell cycle by flow cytometry. *Methods Mol Biol* 2004;281:301-11.
495. Smith PJ, Wiltshire M, Davies S, Patterson LH, Hoy T. A novel cell permeant and far red-fluorescing DNA probe, DRAQ5, for blood cell discrimination by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1999;229:131-9.
496. Smith PJ, Blunt N, Wiltshire M, et al. Characteristics of a novel deep red/infrared fluorescent cell-permeant DNA probe, DRAQ5, in intact human cells analyzed by flow cytometry, confocal and multiphoton microscopy. *Cytometry* 2000;40:280-91.
497. Wiltshire M, Patterson LH, Smith PJ. A novel deep red/low infrared fluorescent flow cytometric probe, DRAQ5NO, for the discrimination of intact nucleated cells in apoptotic cell populations. *Cytometry* 2000;39:217-23.

498. Mitsiades CS, Mitsiades N, Hideshima T, Richardson PG, Anderson KC. Proteasome Inhibition as a New Therapeutic Principle in Hematological Malignancies. *Current Drug Targets* 2006;7:1341-7.
499. Ma MH, Yang HH, Parker K, et al. The Proteasome Inhibitor PS-341 Markedly Enhances Sensitivity of Multiple Myeloma Tumor Cells to Chemotherapeutic Agents. *Clin Cancer Res* 2003;9:1136-44.
500. San Miguel JF, Schlag R, Khuageva NK, et al. Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. *The New England journal of medicine* 2008;359:906-17.
501. Hideshima T, Richardson P, Chauhan D, et al. The Proteasome Inhibitor PS-341 Inhibits Growth, Induces Apoptosis, and Overcomes Drug Resistance in Human Multiple Myeloma Cells. *Cancer research* 2001;61:3071-6.
502. LeBlanc R, Catley LP, Hideshima T, et al. Proteasome Inhibitor PS-341 Inhibits Human Myeloma Cell Growth in Vivo and Prolongs Survival in a Murine Model. *Cancer research* 2002;62:4996-5000.
503. Fisher RI, Bernstein SH, Kahl BS, et al. Multicenter Phase II Study of Bortezomib in Patients With Relapsed or Refractory Mantle Cell Lymphoma. *J Clin Oncol* 2006;24:4867-74.
504. Bold RJ, Virudachalam S, McConkey DJ. Chemosensitization of pancreatic cancer by inhibition of the 26S proteasome. *J Surg Res* 2001;100:11 - 7.
505. Fahy BN, Schlieman MG, Virudachalam S, Bold RJ. Schedule-dependent molecular effects of the proteasome inhibitor bortezomib and gemcitabine in pancreatic cancer. *J Surg Res* 2003;113:88 - 95.
506. Mitsiades N, Mitsiades CS, Richardson PG, et al. The proteasome inhibitor PS-341 potentiates sensitivity of multiple myeloma cells to conventional chemotherapeutic agents: therapeutic applications. *Blood* 2003;101:2377-80.
507. Denlinger CE, Rundall BK, Keller MD, Jones DR. Proteasome Inhibition Sensitizes Non-Small-Cell Lung Cancer to Gemcitabine-Induced Apoptosis. *The Annals of Thoracic Surgery* 2004;78:1207-14.
508. Denlinger CE, Rundall BK, Jones DR. Proteasome inhibition sensitizes non-small cell lung cancer to histone deacetylase inhibitor-induced apoptosis through the generation of reactive oxygen species. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004;128:740 - 8.
509. Chou T-C, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in enzyme regulation* 1984;22:27-55.
510. Jones LK, Saha V. Chromatin modification, leukaemia and implications for therapy. *British journal of haematology* 2002;714-27.
511. Marks P, Rifkind RA, Richon VM, et al. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat Rev Cancer* 2001;1:194-202.
512. Sengupta N, Seto E. Regulation of histone deacetylase activities. *J Cell Biochem* 2004;93:57-67.
513. Timmermann S, Lehrmann H, Polesskaya A, Harel-Bellan A. Histone

- acetylation and disease. *Cell Mol Life Sci* 2001;728-36.
514. Maiso P, Carvajal-Vergara X, Ocio EM, et al. The Histone Deacetylase Inhibitor LBH589 Is a Potent Antimyeloma Agent that Overcomes Drug Resistance. *Cancer research* 2006;66:5781-9.
515. Miller TA, Witter DJ, Belvedere S. Histone deacetylase inhibitors. *J Med Chem* 2003;46:5097-116.
516. Lowenberg B, Griffin JD, Tallman MS. Acute myeloid leukemia and acute promyelocytic leukemia. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology* 2003:82-101.
517. King RW, Deshaies RJ, Peters J-M, Kirschner MW. How Proteolysis Drives the Cell Cycle. *Science (New York, NY)* 1996;274:1652-9.
518. Kane RC, Farrell AT, Sridhara R, Pazdur R. United States Food and Drug Administration Approval Summary: Bortezomib for the Treatment of Progressive Multiple Myeloma after One Prior Therapy. *Clin Cancer Res* 2006;12:2955-60.
519. Mateos M-V, Hernandez J-M, Hernandez M-T, et al. Bortezomib plus melphalan and prednisone in elderly untreated patients with multiple myeloma: results of a multicenter phase 1/2 study. *Blood* 2006;108:2165-72.
520. Richardson PG, Barlogie B, Berenson J, et al. A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *The New England journal of medicine* 2003;348:2609 - 17.
521. Richardson PG, Sonneveld P, Schuster MW, et al. Bortezomib or High-Dose Dexamethasone for Relapsed Multiple Myeloma. *The New England journal of medicine* 2005;352:2487-98.
522. Roccaro AM, Hideshima T, Richardson PG, et al. Bortezomib as an Antitumor Agent Current Pharmaceutical Biotechnology 2006;7:441-8.
523. Shah MH, Young D, Kindler HL, et al. Phase II Study of the Proteasome Inhibitor Bortezomib (PS-341) in Patients with Metastatic Neuroendocrine Tumors. *Clin Cancer Res* 2004;10:6111-8.
524. Orłowski RZ, Voorhees PM, Garcia RA, et al. Phase 1 trial of the proteasome inhibitor bortezomib and pegylated liposomal doxorubicin in patients with advanced hematologic malignancies. *Blood* 2005;105:3058-65.
525. Maki RG, Kraft AS, Scheu K, et al. A multicenter Phase II study of bortezomib in recurrent or metastatic sarcomas. *Cancer* 2005;103:1431-8.
526. .
527. Cortes J, Thomas D, Koller C, et al. Phase I Study of Bortezomib in Refractory or Relapsed Acute Leukemias. *Clin Cancer Res* 2004;10:3371-6.
528. Orłowski RZ. Phase 1 trial of the proteasome inhibitor bortezomib and pegylated liposomal doxorubicin in patients with advanced hematologic malignancies. *Blood* 2005;105:3058-65.
529. Attar EC, De Angelo DJ, Supko JG, et al. Phase I and pharmacokinetic study of bortezomib in combination with idarubicin and cytarabine in patients with acute myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res* 2008;14:1446-54.
530. Hideshima T, Mitsiades C, Akiyama M, et al. Molecular mechanisms mediating antimyeloma activity of

- proteasome inhibitor PS-341. *Blood* 2003;101:1530-4.
531. Bazzaro M, Lee MK, Zoso A, et al. Ubiquitin-Proteasome System Stress Sensitizes Ovarian Cancer to Proteasome Inhibitor-Induced Apoptosis. *Cancer research* 2006;66:3754-63.
532. Drexler HC. The role of p27Kip1 in proteasome inhibitor induced apoptosis. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 2003;2:438-41.
533. Ling Y-H, Liebes L, Jiang J-D, et al. Mechanisms of Proteasome Inhibitor PS-341-induced G2-M-Phase Arrest and Apoptosis in Human Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines. *Clin Cancer Res* 2003;9:1145-54.
534. Yang Y, Ikezoe T, Saito T, Kobayashi M, Koeffler HP, Taguchi H. Proteasome inhibitor PS-341 induces growth arrest and apoptosis of non-small cell lung cancer cells via the JNK/c-Jun/AP-1 signaling. *Cancer Sci* 2004;95:176 - 80.
535. Suarez L, Vidriales MB, Moreno MJ, et al. Differences in anti-apoptotic and multidrug resistance phenotypes in elderly and young acute myeloid leukemia patients are related to the maturation of blast cells. *Haematologica* 2005;90:54-9.
536. Guzman ML, Neering SJ, Upchurch D, et al. Nuclear factor- κ B is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells. *Blood* 2001;98:2301-7.
537. Guzman ML, Swiderski CF, Howard DS, et al. Preferential induction of apoptosis for primary human leukemic stem cells. *PNAS* 2002;99:16220-5.
538. Jiang Y, Dunbar A, Gondek LP, et al. Aberrant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML. *Blood* 2009;113:1315-25.
539. Drummond DC, Noble CO, Kirpotin DB, Guo Z, Scott GK, Benz CC. Clinical development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005;45:495-528.
540. Amin HM, Saeed S, Alkan S. Histone deacetylase inhibitors induce caspase-dependent apoptosis and downregulation of daxx in acute promyelocytic leukaemia with t(15;17). *British journal of haematology* 2001;115:287-97.
541. Nebbioso A, Clarke N, Voltz E, et al. Tumor-selective action of HDAC inhibitors involves TRAIL induction in acute myeloid leukemia cells. *Nature medicine* 2005;11:77-84.
542. Suzuki T, Ando T, Tsuchiya K, et al. Synthesis and histone deacetylase inhibitory activity of new benzamide derivatives. *J Med Chem* 1999;42:3001-3.
543. Saito A, Yamashita T, Mariko Y, et al. A synthetic inhibitor of histone deacetylase, MS-27-275, with marked in vivo antitumor activity against human tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999;96:4592-7.
544. Gottlicher M, Minucci S, Zhu P, et al. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *The EMBO journal* 2001;20:6969-78.
545. Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA, Klein PS. Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *The*

- Journal of biological chemistry 2001;276:36734-41.
546. Barbetti V, Gozzini A, Rovida E, et al. Selective anti-leukaemic activity of low-dose histone deacetylase inhibitor ITF2357 on AML1/ETO-positive cells. *Oncogene* 2008;27:1767-78.
547. Henderson C, Mizzau M, Paroni G, Maestro R, Schneider C, Brancolini C. Role of caspases, Bid, and p53 in the apoptotic response triggered by histone deacetylase inhibitors trichostatin-A (TSA) and suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA). *The Journal of biological chemistry* 2003;278:12579-89.
548. Qi H, Ratnam M. Synergistic induction of folate receptor beta by all-trans retinoic acid and histone deacetylase inhibitors in acute myelogenous leukemia cells: mechanism and utility in enhancing selective growth inhibition by antifolates. *Cancer research* 2006;66:5875-82.
549. Rassool FV, Gaymes TJ, Omidvar N, et al. Reactive oxygen species, DNA damage, and error-prone repair: a model for genomic instability with progression in myeloid leukemia? *Cancer research* 2007;67:8762-71.
550. Martin SA, Lord CJ, Ashworth A. DNA repair deficiency as a therapeutic target in cancer. *Current opinion in genetics & development* 2008;18:80-6.
551. Sallmyr A, Fan J, Rassool FV. Genomic instability in myeloid malignancies: increased reactive oxygen species (ROS), DNA double strand breaks (DSBs) and error-prone repair. *Cancer Lett* 2008;270:1-9.
552. Ley TJ, Mardis ER, Ding L, et al. DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature* 2008;456:66-72.
553. Darzynkiewicz Z, Traganos F, Wlodkowic D. Impaired DNA damage response--an Achilles' heel sensitizing cancer to chemotherapy and radiotherapy. *Eur J Pharmacol* 2009;625:143-50.