

PATRÍCIA YOSHIOKA JOTTA

**“MUTAÇÕES DE PTEN NAS LEUCEMIAS LINFÓIDES
AGUDAS T”**

**CAMPINAS
2012**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



PATRÍCIA YOSHIOKA JOTTA

“MUTAÇÕES DE PTEN NAS LEUCEMIAS LINFÓIDES

AGUDAS T”

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
PATRÍCIA YOSHIOKA JOTTA
[Assinatura]
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética Animal e Evolução.

Orientador: Prof. Dr. José Andres Yunes

CAMPINAS,
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

J811m Jotta, Patricia Yoshioka, 1985-
Mutações de PTEN nas leucemias linfóides agudas T
/ Patricia Yoshioka Jotta. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: José Andres Yunes.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Proteína PTEN. 2. Proteínas PI3K/Akt. 3.
Leucemia-linfoma linfoblástico de células T precursoras.
4. Receptor Notch1. I. Yunes, José Andres. II.
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: PTEN mutation in T-cell acute lymphoblastic leukemia

Palavras-chave em Inglês:

PTEN protein

PI3K/Akt proteins

Precursor T-Cell Lymphoblastic Leukemia-Lymphoma

Notch1 receptor

Área de concentração: Genética Animal e Evolução

Titulação: Doutor em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

José Andres Yunes [Orientador]

Letícia Frohlich Archângelo

Carlos Alberto Scrideli

Sandra Martha Gomes Dias

Dirce Maria Carraro

Data da defesa: 21-08-2012

Programa de Pós Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 21 de Agosto de .2012

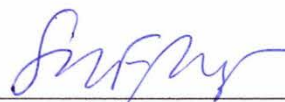
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Andres Yunes (Orientador)



Assinatura

Prof(a). Dr(a). Letícia Frohlich Archângelo



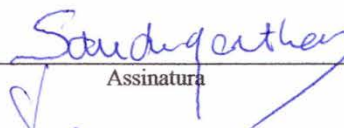
Assinatura

Prof(a). Dr(a). Carlos Alberto Scrideli



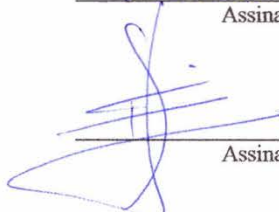
Assinatura

Prof(a). Dr(a). Sandra Martha Gomes Dias



Assinatura

Prof(a). Dr(a). Dirce Maria Carraro



Assinatura

Prof(a). Dr(a). Liana Maria Cardoso Verinaud

Assinatura

Prof(a). Dr(a). Sérgio Luis Felisbino

Assinatura

Prof(a). Dr(a). Maria Sol Brassesco Annichini

Assinatura

Aos meus pais, Laercio e Tieco, pelo apoio incondicional
e a todas as crianças e adolescentes com leucemia e
seus familiares que permitiram a realização
deste trabalho.

Agradecimentos

Agradeço:

Ao Jose Andres Yunes por ser meu orientador desde a iniciação científica. Pelos conselhos e paciência nesses anos.

Aos familiares e pacientes do Centro Infantil Boldrini que possibilitaram esse estudo.

A Dr(a) Silvia Brandalise por permitir esse estudo.

A FAPESP pela bolsa de doutorado concedida.

Ao Dr João Barata pela colaboração e ajuda durante esse trabalho.

Aos meus amigos do laboratório de Biologia Molecular (Ana Luiza, Ana Luisa Mosca, Mônica, Amanda, Rafael, André) pela inestimável amizade e ajuda durante esses anos. E também pelas confraternizações.

As minhas amigas do laboratório de Citogenética (Lilian e Seleny) pela amizade

Aos amigos do laboratório de Análises Clínicas pelo carinho.

A Carol Arruda por ter sido minha aluna e por me ensinar muitas coisas.

Ao pessoal do CIPOI pela colaboração e amizade.

A Dr(a). Letícia Frohlich Archângelo e a Sandra Martha Gomes Dias pelos conselhos e dicas durante a minha pré-banca.

Aos membros da banca por aceitarem o convite e pelas correções.

Ao Dr. Fábio Papes por me acolher em seu laboratório.

Ao pessoal do laboratório do Dr. Fabio Papes por me ajudarem.

Ao Dr. Sergio Felisbino e seus alunos pela ajuda e por me receberem tão calorosamente.

Ao Marcio pelos inúmeros sequenciamentos.

Ao Dr. Claudio Werneck pela ajuda com o processo de importação de camundongos.

Ao Dr. Borato pela ajuda com as análises estatísticas.

Ao Dr. Geraldo Passo e Paula Barbim Geraldo A. S. Passos pela ajuda.

Aos meus amigos Kívia, Luciana, Gustavo, Débora, Ayana que me apoiaram em todo o trajeto desde a graduação até hoje.

Aos meus amigos Bruna, Lucas, Solange, Sato, Célio e Lícia pela companhia inestimável nos momentos de alegria e crise.

Ao meu amor, Herlon, pela compreensão e carinho.

As minhas avós pela compreensão dos almoços de família em que não pude ir e por todo o carinho.

Aos meus pais pelo apoio, dedicação e amor desde o dia em que nasci.

Resumo

A leucemia linfóide aguda (LLA) é o câncer mais frequente na infância, e destas, 15% são do tipo T (LLA-T). A hiperativação da via PI3K/Akt tem sido amplamente descrita em tumores e em linhagens celulares de LLA-T. PTEN é o principal regulador negativo dessa via e frequentemente encontra-se inativado em cânceres humanos. Com frequência, pacientes com LLA-T apresentam mutações ativadoras de *NOTCH1*. NOTCH1 pode regular transcricionalmente *PTEN*, contudo ainda não está claro como as mutações ativadoras de *NOTCH1* influenciariam a expressão de *PTEN* nas LLA-T. Nós encontramos uma ocorrência de 11 (17,7%) mutações no éxon 7 do *PTEN* em 62 casos de LLA-T estudados consecutivamente. Contudo, nenhuma mutação foi encontrada na análise de 71 casos de LLA-B derivada. A maioria das mutações de *PTEN* apresentavam inserções/deleções de mais de 3 nucleotídeos. Não encontramos associação entre mutações em *PTEN* e o gênero, a idade e a contagem de glóbulos brancos ao diagnóstico. Pacientes com alterações no *PTEN* apresentaram uma tendência a pior sobrevida global (OS, $p=0.07$). Dentre os pacientes de LLA-T classificados como alto risco ($n=56$), aqueles possuindo anormalidades no *PTEN* mostraram-se associados significativamente a menor OS ($p=0.019$) e sobrevida livre de leucemia (LFS 47% vs 76%; $p=0.045$). As curvas de LFS foram significativamente diferentes ($p=0.003$), mesmo considerando apenas pacientes que atingiram a remissão no dia 28 do tratamento para a análise. Nosso estudo também mostrou que pacientes com mutações em *NOTCH1* apresentavam aumento na transcrição de *MYC* e menor expressão de *PTEN* mRNA comparados a pacientes com *NOTCH1* selvagem. Nós

recentemente demonstramos que células de LLA-T apresentavam fosforilação de PTEN mediada por CK2, resultando na estabilização e consequentemente inativação da proteína PTEN. Corroborando ao estudo anterior, os casos de LLA-T analisados, independente do *status* de mutação em *NOTCH1*, expressam níveis significativamente mais altos de proteína PTEN do que controles normais. Para avaliar o impacto da regulação transcricional de NOTCH e a inativação postranscricional por CK2 de PTEN, nós tratamos as células de LLA-T com inibidores de gamma-secretase (DAPT e de CK2 (DRB/TBB)). Nosso estudo enfatiza a relevância biológica e clínica da regulação do PTEN em LLA-T. E sugerimos o uso combinado de inibidores de gamma-secretase e CK2 devem possuir potencial terapêutico nas LLA-T.

Abstract

T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) accounts for approximately 15% of pediatric ALL. Patients with T-ALL are at increased risk of relapse compared with children treated for B-cell precursor ALL. Mutations in the phosphatase and tensin homolog (PTEN) gene leading to PTEN protein deletion and subsequent activation of the PI3K/Akt signaling pathway are common in cancer. PTEN is the main negative regulator of the PI3K/Akt survival pathway. T-ALL patients frequently display *NOTCH1* activating mutations and Notch can transcriptionally down-regulate the tumor suppressor *PTEN*. However, it is not clear whether *NOTCH1* mutations associate with decreased *PTEN* expression in primary T-ALL. We report that *PTEN* exon 7 mutations occurred in 11 (17.7%) out of 62 consecutive pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) but in none of 71 precursor B-ALL patients. Most *PTEN* mutations were insertions/deletions of more than 3 nucleotides. No associations were found between *PTEN* mutation and age, gender, WBC at diagnosis, early response to therapy and remission rate. Patients with *PTEN* mutation (n=11) had a tendency toward worse overall survival (OS, $p=0.07$). Remarkably, *PTEN* mutations were significantly associated with lower OS ($p=0.019$) and leukemia-free survival (LFS 47% vs 76%, $p=0.045$) within patients classified in the high risk group (n=56). LFS curves were significantly different ($p=0.003$) even if only patients who reached remission on day 28 were considered for analysis. We compared patients with or without *NOTCH1* mutations and report that the former presented higher *MYC* transcript levels and decreased *PTEN* mRNA expression. We recently showed that T-ALL cells frequently display CK2-mediated PTEN phosphorylation, resulting in PTEN protein stabilization and concomitant functional inactivation. Accordingly, the T-ALL samples analyzed, irrespectively of their *NOTCH1* mutational status, expressed significantly higher PTEN protein levels than normal controls. To evaluate the integrated functional impact of NOTCH transcriptional and CK2 post-translational inactivation of PTEN, we treated TALL cells with both the gamma-secretase inhibitor DAPT and the CK2 inhibitors DRB/TBB. Our data suggest that combined use of gamma-secretase and CK2 inhibitors may have therapeutic

potential in T-ALL. And emphasize the biological and clinical relevance of PTEN regulation in pediatric T-ALL.

Índice

1- Introdução.....	3
1.1- A Leucemia Linfóide Aguda de linhagem T.....	4
1.2- O desenvolvimento de Linfócitos T	5
1.3- Alterações genéticas na LLA-T.....	8
1.4- Via de sinalização PI3K/Akt.....	10
2- Objetivos.....	13
3- Capítulo I: PTEN na LLA-T	15
3.1- Introdução - PTEN (Phosphatase and tensin homolog)	16
3.2- Resultados - Manuscrito:.....	22
3.3- Discussão.....	27
4- Capítulo II: Mutações de <i>NOTCH1</i> , expressão de <i>PTEN</i> e novas drogas contra a LLA-T	33
4.1- Introdução - NOTCH1	34
4.2- Resultados - Manuscrito:.....	40
4.3- Discussão.....	48
5- Conclusão.....	51
6- Referências	53
7- Anexo: Comprovante de aprovação do Comitê de Ética Local	60

Lista de Figuras

Figura 1: Ilustração do desenvolvimento dos linfócitos T..	7
Figura 2: Via de sinalização PI3K/AKT	11
Figura 3: Ilustração da estrutura da proteína PTEN em relação aos éxons do gene. ...	16
Figura 4: Ilustração da via de sinalização PTEN-PI3K.	17
Figura 5: Ilustração do impacto da deficiência de <i>PTEN</i> na hematopoiese.....	18
Figura 6: Ilustração do mecanismo de regulação pós-traducional da atividade fosfatase de PTEN.....	20
Figura 7: Representação esquemática de todas as mutações conhecidas no gene <i>PTEN</i> em LLA-T pediátrica.....	27
Figura 8: Alinhamento de <i>PTEN</i> e seu pseudogene (AF023139) com todas as mutações pontuais descritas por Larson Gedman <i>et al.</i>	32
Figura 9: Ilustração da ativação de NOTCH 1.....	35
Figura 10: Esquema da proteína precursora NOTCH1, mostrando as Subunidades.....	36
Figura 11: Interrelação entre NOTCH1 e PI3K/AKT na leucemogenese da LLA-T	38

1- Introdução

1.1- A Leucemia Linfóide Aguda de linhagem T

A leucemia consiste em uma doença heterogênea, caracterizada por uma disfunção das células progenitoras hematopoéticas da medula óssea, levando a uma proliferação clonal desordenada e sem controle de células precursoras de origem mielóide ou linfóide. Desse modo, a hematopoese normal é prejudicada. Quando ocorre proliferação clonal descontrolada de linfócitos imaturos, temos a Leucemia Linfóide Aguda (LLA) (Kebriaei *et al.* 2003). Dependendo do linfócito envolvido podemos ter: LLA de células B (envolve precursores B) e LLA de células T (envolve precursores T).

A Leucemia Linfóide Aguda é o câncer mais frequente na infância e 85% dos casos é de linhagem B e, de forma geral, as LLA-T (15% dos casos) apresentam um prognóstico desfavorável se comparadas com as LLA de células B. Com a intensificação dos tratamentos quimioterápicos, a sobrevida livre de eventos (SLE) e a sobrevida global (OS) das LLA-T tem alcançado uma taxa de 70-80% (Scridelli *et al.* 2009, Pieters & Carroll 2008; Pui & Evans 2006). Contudo 20-30% dos casos de LLA-T pediátrica ainda recaem e eventualmente vão a óbito (Pieters & Carroll 2008; Pui & Evans 2006). Assim, o estudo da leucemogenese da LLA-T é importante para descobertas de novos alvos terapêuticos.

A LLA-T resulta de células precursoras T que adquirem vantagem proliferativa durante seu desenvolvimento no timo (Uckun *et al.* 1997). As LLA-T podem ser subdivididas quanto ao imunofenótipo em cinco subtipos: pro-LLA-T, pre-LLA-T, LLA-T cortical e LLA-T madura $\alpha\beta$ ou madura $\gamma\delta$. Todos os subtipos expressam CD3 citoplasmático. Apenas LLA-T cortical expressa CD1 α . E a presença de receptores de células T (TCR) $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$ a classifica como madura (Kraszewska *et al.* 2012).

A transformação dos linfócitos T em células leucêmicas envolve alterações em oncogenes e genes supressores de tumor, que cooperam para alterar as vias de sinalização que regulam a proliferação, a diferenciação e a sobrevivência dos linfócitos T em desenvolvimento (Martelli *et al.* 2012), ocasionando uma parada no desenvolvimento normal dos timócitos (Uckun *et al.* 1997).

1.2- O desenvolvimento de Linfócitos T

As células tronco hematopoéticas (HSC) na medula óssea se diferenciam em células progenitoras multipotentes (MPP), perdendo a capacidade de auto-renovação. As MPP originam células progenitoras mielóides (CMP) e linfóides comum (CLP). As CLP possuem a capacidade de originar as linhagens B e T. As CMP originam as células progenitoras de granulócitos e monócitos (GMP) e de megacariócitos e eritrócitos (MkEP) (Adolfsson *et al.* 2005).

As células CLP saem da medula óssea e migram para o timo. No processo de maturação das células T, os timócitos precisam se deslocar pelos vários microambientes especializados do timo, adquirindo imunocompetência. (Takahama 2006). O estroma do timo é composto por diversas células: células epiteliais corticais e medulares, fibroblastos mesenquimais, macrófagos derivados da medula óssea e células dendríticas (Rodewald *et al.* 2008). O microambiente especializado de diferentes regiões do timo por onde os timócitos passam produz os sinais externos que conduzem à maturação das células precursoras dos linfócitos T imaturos (Figura 1) (Anderson *et al.* 2000).

O comprometimento das CLP com a linhagem T ocorre no timo através da ativação da proteína NOTCH1, que inibe a diferenciação das células progenitoras (CLP) em linhagem B (Pui *et al.* 1999, Heinzl *et al.* 2007). Esses precursores (CD34+/CD7+) entram pela junção córtex-medula do timo, migram para a camada subcapsular do córtex tímico, voltam para a região medular e finalmente deixam o timo. A migração dentro do timo é mediada pela expressão estágio-específico nos timócitos de diferentes receptores de quimiocinas (Figura 1) (Takahama 2006).

Ao entrar no timo, os timócitos DN (duplo negativo, CD4-/CD8-) são atraídos para a região periférica do mesmo (região subcapsular) pelos receptores CXCR4 e CCR7, e no caminho passam a expressar também o CCR9, todos contribuindo para a chegada dos timócitos até a região subcapsular. No transcurso até a região subcapsular ocorre o rearranjo V(D)J do receptor de células T (TCR), processo fundamental para posterior seleção dos timócitos. A ativação dos genes *RAG1* e *RAG2* são essenciais para o

rearranjo da região variável do TCR (Kuo & Schlissel 2009). Os timócitos podem expressar 2 tipos de TCR: $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$. A sobrevivência e o desenvolvimento dos timócitos TCR $\alpha\beta$ é dependente da ativação de NOTCH1, enquanto TCR $\gamma\delta$ é independente (Washburn *et al.* 1997, Guidos 2006). Os timócitos passam por sua primeira seleção (seleção β) verificando se o rearranjo de TCR β ocorreu "*in frame*". Aqueles que conseguiram expressar TCR β estão aptos a prosseguir o processo de maturação e começam a expressar CD4 e CD8. Ao mesmo tempo os timócitos que conseguiram expressar TCR $\gamma\delta$ sobrevivem e originam linfócitos $\gamma\delta$ (Rothenberg *et al.* 2008).

Na região subcapsular, ocorre a maturação para o estágio de DP (duplo positivo, CD4+/CD8+). Uma vez atingido o estágio DP, os timócitos iniciam a migração em direção ao centro do timo (medula), e no transcurso interagem com o estroma cortical. Durante a interação com o estroma ocorre seleção positiva e negativa, processo este que elimina mais de 95% dos timócitos (Takahama 2006). Após esta seleção os timócitos amadurecem para o estágio de simples positivo (SP, CD4+/CD8- ou CD4-/CD8+) (Figura 1). A interação dos timócitos com o estroma testa a habilidade dos TCR em reconhecer o MHC (Complexo principal de histocompatibilidade), determinando assim a escolha da linhagem (CD4 ou CD8). Aqueles que reconhecem o MHC de classe I serão SP CD8 e o MHC classe II, SP CD4. A proteína NOTCH1 influencia na progressão dos timócitos SP CD8 após a seleção por afinidade a MHC (Yasutomo *et al.* 2000).

As células SP sofrem aumento da expressão de CCR7 e são atraídas para a medula do timo. Não se sabe ainda como o CCR7 pode atuar na migração nos dois sentidos, ou seja, na migração em direção à periferia (região córtex/medular → subcapsular) e na migração para o centro (córtex→medula). Na medula do timo os timócitos permanecem por 12 dias aproximadamente, passando a expressar integrinas (CD62L e CD69) e sofrem nova seleção negativa. Em seguida, expressam S1P1 (sphingosine-1-phosphatase receptor 1), de modo que são atraídos para fora do timo pelos altos níveis de sphingosine-1-phosphatase no sangue (Takahama 2006).

O processo de maturação dos timócitos está sob a regulação das proteínas E2A/HEB e NOTCH1 (Graux *et al.* 2006). O complexo E2A/HEB é responsável pela

regulação da expressão de TCR α e β , CD5, RAG2 e CD4 (O'Neil *et al.* 2004). Além de estar envolvido no comprometimento das células progenitoras com a linhagem T, NOTCH1 também é responsável pela sobrevivência, proliferação e metabolismo dos timócitos DN através da ativação da via PI3K/AKT (Phosphatidylinositol 3 -kinase) (Figura 1) (Aifants *et al.* 2008, Palomero *et al.* 2006).

Quando ocorre uma parada na diferenciação dos timócitos no timo e um desenvolvimento clonal e descontrolado dessas células, temos a LLA-T (Uckun *et al.* 1997). A maioria dos genes envolvidos no desenvolvimento dos linfócitos T foram primeiramente descritos nas leucemias.

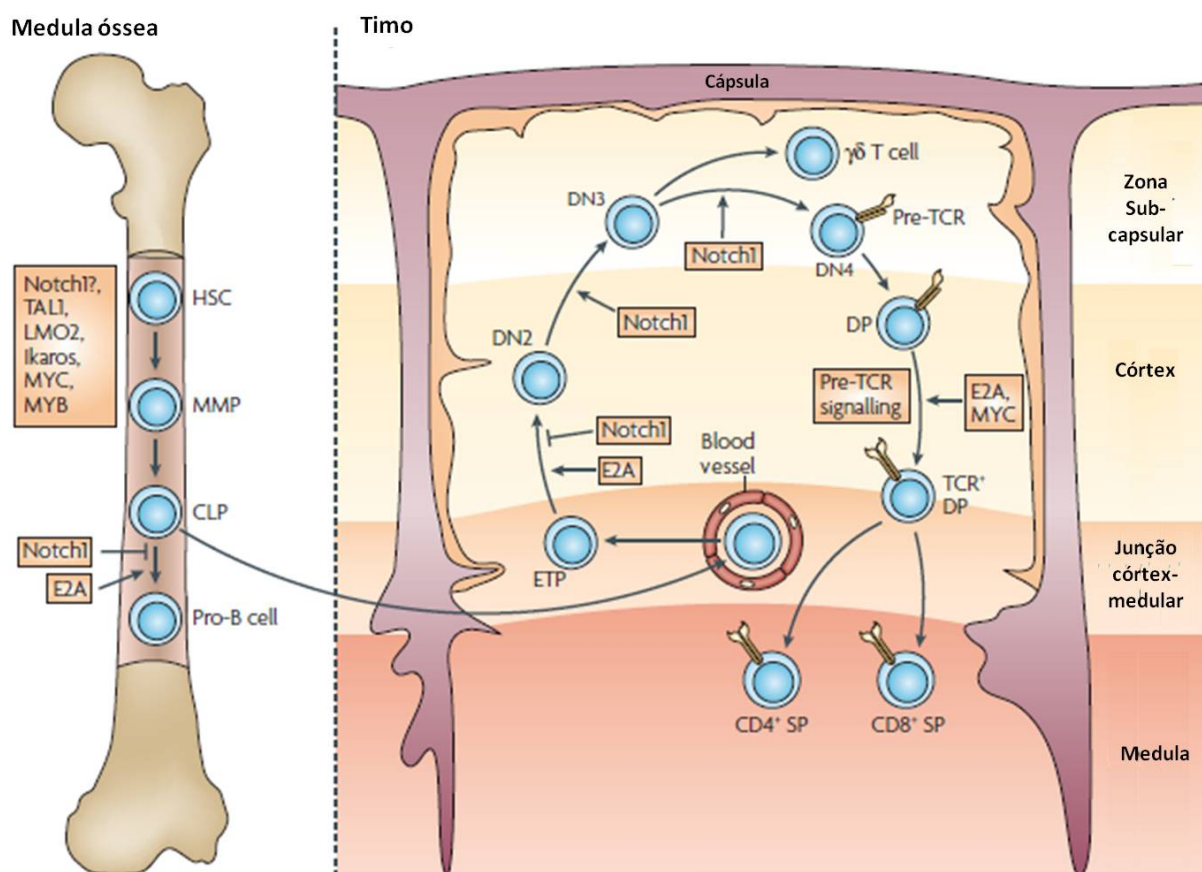


Figura 1: Ilustração do desenvolvimento dos linfócitos T, mostrando os principais eventos e o papel de NOTCH1 durante o processo. CPL: célula progenitora comum (Adaptado de Aifants *et al.* 2008).

1.3- Alterações genéticas na LLA-T

A leucemogênese da LLA-T é um processo complexo que envolve múltiplas lesões genéticas em oncogenes e genes supressores de tumor modificando a regulação da proliferação, da diferenciação e da sobrevivência dos linfócitos T em desenvolvimento (Martelli *et al.* 2012).

Aproximadamente 50% das LLA-T apresentam aberrações cromossômicas. As translocações encontradas frequentemente envolvem genes *TCR* e fatores de transcrição, levando a superexpressão de oncogenes (*HOX11*, *TLX3*, *HOXA*, *TAL1*, *TAL2*, *LYL1*, *BHLHB1*, *LMO1*, *LMO2*, *LCK*, *CCND2*, *NOTCH1*). Outras lesões encontradas são translocações que formam proteínas quiméricas oncogênicas (*CALM-AF10*, *NUP214-ABL1*, *MLL-ENF*, *MLL-AF10*, *MLL-AF6*, *MLL-AFX1*, *MLL-AF4*, *EML1-ABL1*, *TEL-ABL1*, *TEL-JAK2*, *BCR-ABL1*, *NUP98-RAP1GDS1*). Deleções crípticas levam a perda de genes supressores de tumor (perda do *INK4/ARF* locus, cromossomo 6q, 1p32 leva a expressão anormal de *SIL-TAL1*) (Ferrando *et al.* 2002, Graux *et al.* 2006).

Muitos dos genes envolvidos nas translocações cromossômicas da LLA-T (descritas acima) regulam a diferenciação dos linfócitos T no timo, dessa forma a sua superexpressão pode ser relacionada a estágios de desenvolvimento dos timócitos, como: *LYL1*+ aos timócitos DN, *TLX1*+ ao DP imaturo (sem expressão de CD3) e *TAL1* ao DP (Ferrando *et al.* 2002).

A incidência de LLA-T é maior em meninos (Goldberg *et al.* 2003). Recentemente, foram descritas mutações inativadoras e deleções do gene supressor tumoral *PHF6* (Plant Homeodomain Finger 6) ligado ao X em 16% das LLA-T pediátricas e 38% em adultos. Essas mutações estão associadas com a expressão anormal dos oncogenes *TLX1* e *TLX 3* (fatores de transcrição homeobox) (Van Vlierberghe *et al.* 2010). A incidência dessas mutações pode explicar a distribuição da LLA-T entre meninos e meninas.

O sequenciamento massivo do genoma de 12 casos de LLA-T de fenótipo imaturo "early T phenotype" (LLA-ETP), seguido de resequenciamento pontual em um

grupo de 94 LLA-T (incluindo 52 outros casos de LLA-ETP e 42 de LLA-T de fenótipo mais maduro) revelou, entre outras, mutações ativadoras (ganho de função) de genes de receptores de citosinas ou via de RAS (*NRAS*, *KRAS*, *FLT3*, *IL7R*, *JAK3*, *JAK1*, *SH2B3* e *BRAF*), mutações inativadoras (perda de função) em genes do desenvolvimento das células hematopoéticas (*GATA3*, *ETV6*, *RUNX1*, *IKZF1* e *EP300*) e mutações em genes de modificação de histonas (*EZH2*, *EED*, *SUZ12*, *SETD2* e *EP300*) (Zhang *et al.* 2012). A associação estatística entre as diferentes mutações nos diferentes pacientes (nas células cancerosas dos pacientes) sugere haver cooperatividade entre as mesmas.

Mutações somáticas em genomas do câncer podem ser classificadas em 2 grupos: (1) mutações “driver”, que conferem vantagem de crescimento para as células portadoras, são causalmente implicadas no desenvolvimento do câncer e, portanto são selecionadas positivamente; (2) mutações “passenger”, que possivelmente decorrem do processo de instabilidade genômica do câncer, mas não conferem vantagem de crescimento, logo, são neutras (Greenman *et al.* 2007). As mutações “driver” devem estar associadas à resposta clínica dos pacientes. Mutações que atingem vias de sobrevivência e proliferação celular, portanto do grupo de mutações “driver”, justamente por seus efeitos na célula, tem maior probabilidade de associação a peculiaridades da apresentação e/ou evolução clínicas da doença.

A análise de mutações em amostras de camundongos xenógrafos de LLA-T (camundongos imunodeficientes injetados com LLA-T) e no genoma de LLA de recaídas comparada as LLA-T ao diagnóstico sugere que a recaída emerge de subclones leucêmicos que apresentam mutações em oncogenes e genes supressores de tumor que conferem resistência ao tratamento. Estes subclones já estão presentes na população de células leucêmicas do diagnóstico e são selecionados pelo tratamento quimioterápico (Clappier *et al.* 2011). Alguns destes genes fazem parte da via de sinalização de Phosphatidylinositol 3-kinase /AKT (*NOTCH1*, *PTEN*, *MYC*).

As mutações ativadoras de genes de receptores de citocinas e via de RAS (Zhang *et al.* 2012) podem alterar a via de sinalização PI3K/AKT, sendo uma das principais vias de sinalização de sobrevivência e proliferação frequentemente

hiperativada no câncer e nas leucemias T (Martelli *et al.* 2012), assunto desta tese e que será explorado em maiores detalhes a seguir.

1.4- Via de sinalização PI3K/Akt

PI3K são enzimas responsáveis pela fosforilação do 3'-OH do fosfotilinosítois. Essas enzimas são constituídas de duas subunidades: a regulatória (p85 α , p85 β ou p55 γ) e a catalítica (p110 α , p110 β ou p110 δ). Quando ativada por fatores de crescimento a subunidade regulatória recruta e se liga à subunidade catalítica na membrana plasmática, possibilitando a conversão de fosfatidilinosítois-4,5-bisfosfato (PIP2) no segundo mensageiro, fosfatidilinosítois-3,4,5-trifosfato (PIP3). PIP3 atua como importante sítio de ligação de enzimas com domínio homólogo à pleckstrin (PH domain) (Martelli *et al.* 2012; Cantley & Neels. 1999). O principal efetor da via é a serina/treonina quinase, AKT (Figura 2).

A ligação de AKT em PIP3 libera o domínio quinase, dessa maneira permitindo a fosforilação de AKT em Thr308 no sítio de ativação pela fosfoinosítide-quinase dependente (PDK1) e em Ser473 na região hidrofóbica C-terminal pela mTORC2 (mammalian target rapamycin complex-2). Quando ativada, AKT desencadeia uma cascata de reações responsáveis pela proliferação, sobrevivência e metabolismo celular (Martelli *et al.* 2012; Cantley & Neels. 1999). AKT inibe a apoptose da célula através da fosforilação e inativação de proteínas pro-apoptóticas (como BAD, caspase-9, FKHR). E promove a sobrevivência celular por atuação indireta com NF- κ B e p53. AKT atua no ciclo-celular regulando a proliferação celular, promovendo o acúmulo de Ciclin D1. AKT também ativa mTOR por fosforilação, levando a síntese proteica e ao crescimento das células (Vivanco & Sawyers 2002).

PI3K também atua por outras vias independentes de AKT, como SGK (Serum and Glucocorticoid-inducible Kinase), RAC1, CDC42 e proteína quinase C (PKC) (Welch *et al.* 1998, Vivanco & Sawyers 2002).

A via de sinalização PI3K/AKT é regulada negativamente por PTEN (Phosphatase and tensin homolog) que defosforila PIP3 na posição 3'. SHIP (Src Homology 2 Domain-containing Inositol-5-Phosphatase) também atua em PIP3 removendo o fosfato da posição 5' gerando PIP2. A deleção de SHIP1 em células progenitoras T não é capaz de induzir a leucemogênese (Vivanco & Sawyers 2002). Dessa maneira, PTEN é o principal regulador negativo da via PI3K/AKT.

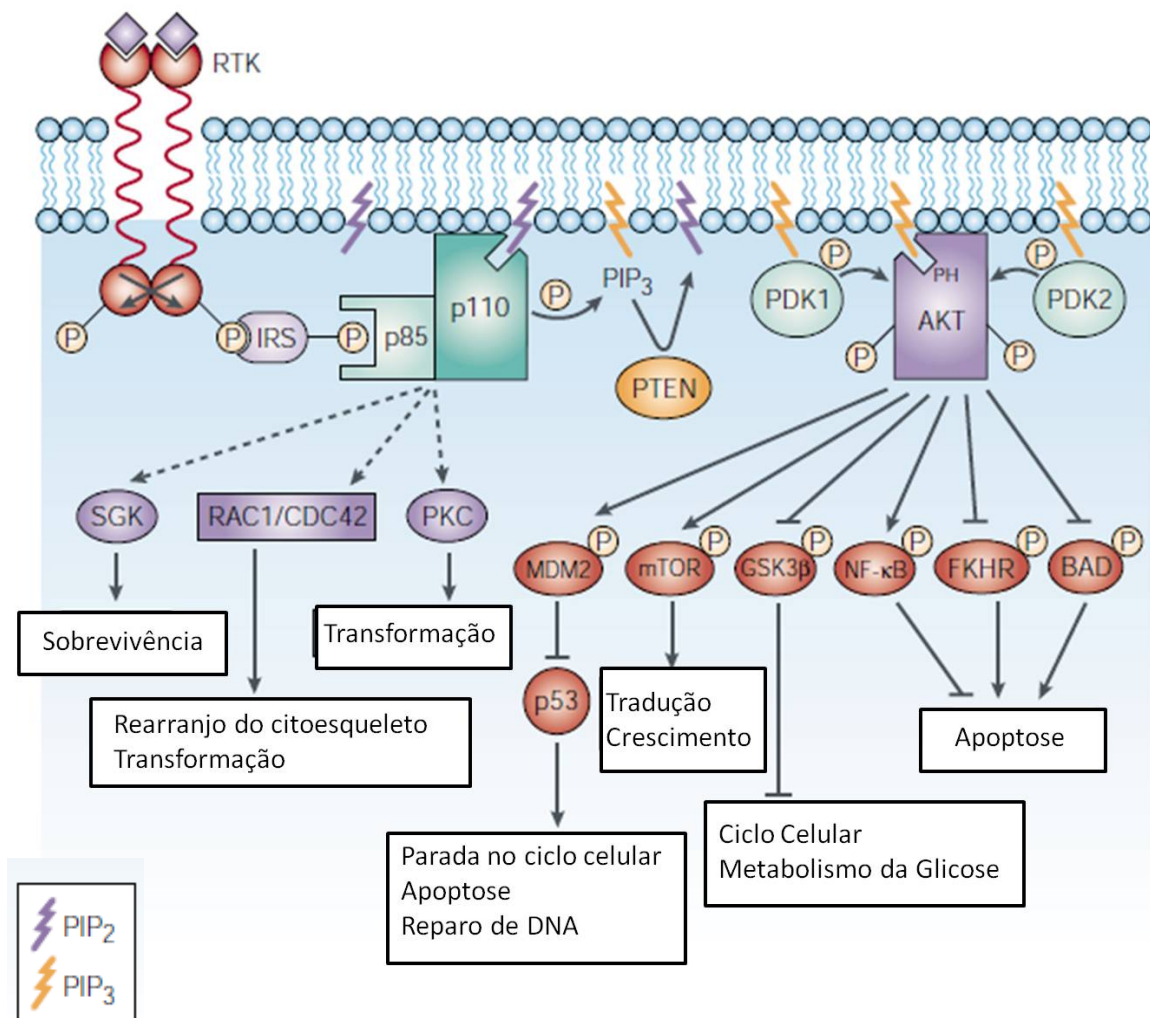


Figura 2: Via de sinalização PI3K/AKT mostrando a relação de PI3K na fosforilação PIP3 e ativação de AKT e a sinalização celular (Adaptado de Vivanco & Sawyers 2002).

A via de sinalização PI3K/AKT foi amplamente relacionada a diversos cânceres humanos (Vivanco & Sawyers, 2002). A ativação constitutiva dessa via em doenças hematológicas malignas, incluindo leucemia mieloide, mieloma múltiplo e leucemia linfocítica granular de grandes células T, é responsável pelo suporte à proliferação e viabilidade celular das células tumorais *in vitro* (Xu *et al.* 2003; Hsu *et al.* 2001; Schade *et al.* 2006). Em modelos animais a ativação da via PI3K/AKT é insuficiente para causar câncer a menos que ocorra uma segunda lesão oncogênica, como por exemplo, ativação em RAS (Vivanco & Sawyers, 2002).

Linhagens celulares de LLA-T não possuem PTEN e/ou SHIP, consequentemente tem a via de sinalização PI3K/AKT ativada (Astoul *et al.* 2001). Barata *et al.* (2004) mostrou que ativação da via de sinalização PI3K/AKT por IL-7 é essencial para o aumento da viabilidade celular e também está envolvido na regulação da atividade metabólica, tamanho e proliferação celular da LLA-T. Desse modo, sugere-se que a ativação dessa via tem um importante papel na biologia da LLA-T. Recentemente, nosso grupo descreveu mutações ativadoras pro-oncogênicas do IL7R em 9% dos casos de LLA-T. Essas mutações poderiam levar a ativação da via PI3K/AKT independente de IL-7 (Zenatti *et al.* 2011).

Silva *et al.* (2008) mostrou que pacientes com LLA-T apresentam hiperativação constitutiva da via PI3K/AKT devido à inativação de PTEN. Explicaremos a respeito no capítulo I desta tese.

2- Objetivos

O objetivo principal desta tese foi analisar a incidência e o valor prognóstico das mutações de *PTEN* em crianças e adolescentes com LLA-T. Numa segunda etapa avaliou-se uma forma de restaurar a atividade de PTEN com vistas ao tratamento das LLA-T. Os objetivos específicos são apresentados em capítulos separados.

No capítulo I, apresentamos:

- Incidência de mutações de *PTEN* em LLA-T pediátricas
- Valor prognóstico das mutações de *PTEN* em LLA-T pediátricas

No capítulo II, apresentamos:

- Efeito de mutações de *NOTCH1* na transcrição de PTEN em LLA-T primária
- Análise do uso combinado de inibidores de CK2 e de gama secretase, como forma de restaurar a atividade de PTEN e de bloquear a atividade de NOTCH1 mutante, respectivamente, contra a LLA-T.

3- Capítulo I: PTEN na LLA-T

3.1- Introdução - PTEN (Phosphatase and tensin homolog)

A proteína PTEN (Phosphatase and tensin homolog) regula negativamente a via de sinalização PI3K (Figura 3), sendo considerada um supressor tumoral. Quando esse gene (localizado no cromossomo 10, em humanos) encontra-se mutado ou inativado, os efetores da via PI3K estão constitutivamente ativos, desencadeando a formação do tumor (Cully *et al.* 2006).

A proteína PTEN é constituída por 403 aminoácidos que compõem 5 domínios funcionais: domínio de ligação a PIP2 (PBD), domínio fosfatase, domínio C2 (importante para a ligação a membrana e desfosforilação de PIP3 (Lee *et al.* 1999)), uma cauda carboxi-terminal (possui domínios PEST) e um domínio de ligação PDZ (liga proteínas regulatórias e de ligação a membrana) (Figura 3) (Song *et al.* 2012).

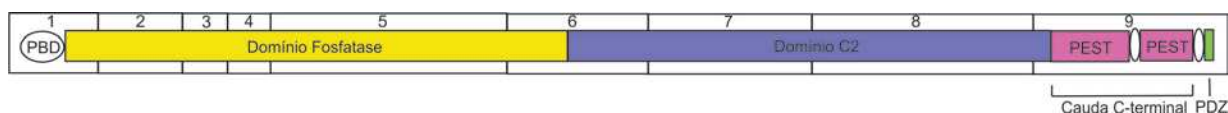


Figura 3: Ilustração da estrutura da proteína PTEN em relação aos éxons do gene. Mostrando os domínios funcionais da proteína (Silva *et al.* 2008).

Para antagonizar o efeito de PI3K, PTEN precisa estar ligada na membrana celular (Figura 4) (Lindsay *et al.* 2006). O domínio fosfatase está envolvido diretamente na ligação de PTEN a membrana, mas a presença do domínio C2 é essencial para a ligação de alta afinidade com a mesma. A fosforilação de S380, T382, T383 na cauda C-terminal impede a ligação na membrana (Das *et al.* 2003). A distribuição intracelular da proteína PTEN entre o núcleo e citoplasma da célula é determinada pela presença de domínio de localização nuclear (NLS) na região N-terminal e de domínios de exclusão nuclear na região C2 e C-terminal. A localização de PTEN no núcleo é dependente da conformação da proteína (exposição do NLS) que "esconde" os motivos de exclusão nuclear (Gil *et al.* 2006). No núcleo PTEN regula, independente de sua atividade fosfatase, o ciclo celular, promove a estabilidade genômica e o reparo do DNA através da regulação transcricional de RAD51 e ativação da via de reparo DBS (Shen *et*

para *PTEN* originam menor número de CLP (progenitor linfóide comum) na medula óssea comparado ao selvagem, mas as demais linhagens (CMP, progenitor mieloide comum; GMP, progenitores de granulocitos e monocitos e MkEP, progenitor de megacariocitos e eritroide) não sofrem alteração. Camundongos 'knockout' de *PTEN* apresentam um bloqueio da linhagem B e a maior diferenciação em células progenitoras de linhagem linfóide T compensando o menor número de CLP. Inativação de *PTEN* resulta no desenvolvimento de síndrome mielodisplásica e de leucemias mieloides e linfóides T. Esses tipos de leucemias são similares às descritas em camundongos transplantados com as HSCs *PTEN* mutantes. Isso sugere que a ativação constitutiva de PI3K/AKT confere vantagens proliferativas a algumas células progenitoras (Figura 5) (Zhang *et al.* 2006).

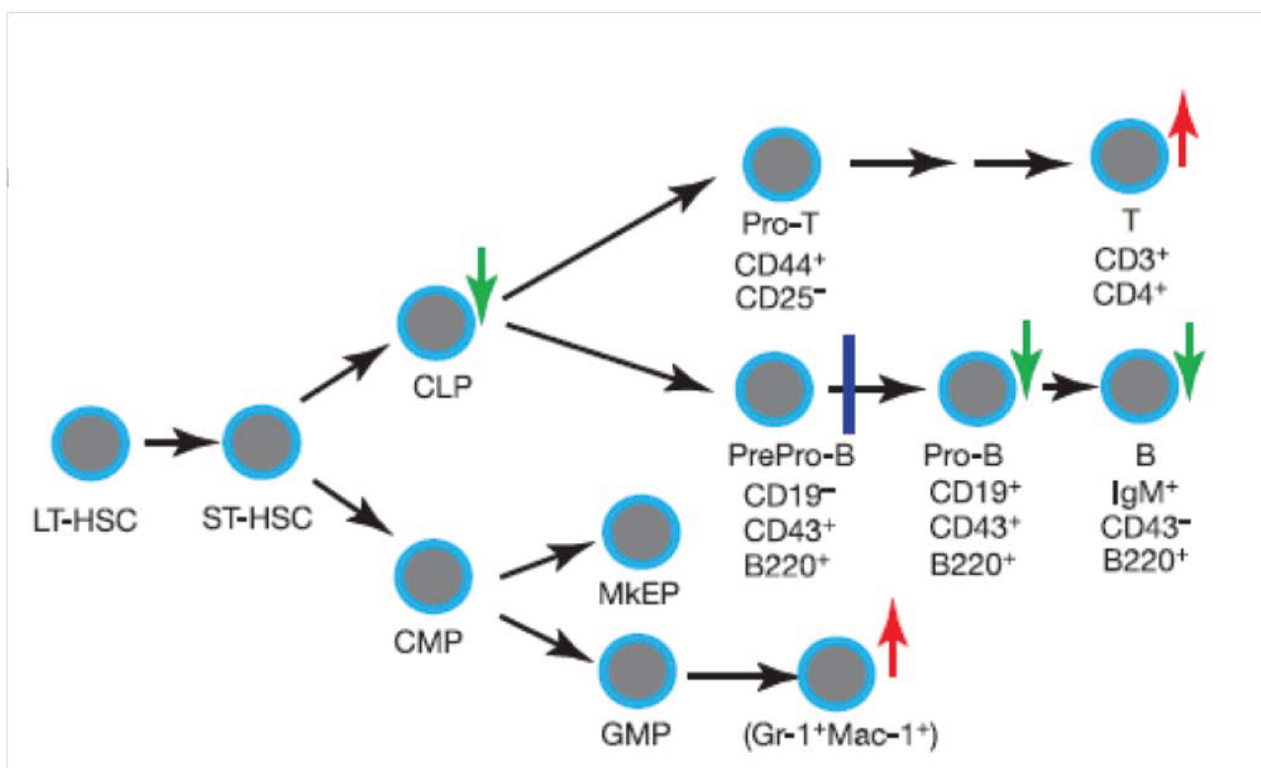


Figura 5: Ilustração do impacto da deficiência de *PTEN* na hematopoiese; o aumento e a diminuição da população celular são marcados com setas vermelhas e verdes, respectivamente. A barra azul indica bloqueio do desenvolvimento (Zhang *et al.* 2006).

Camundongos homozigotos 'knockout' para *PTEN* morrem durante a embriogênese, não permitindo a análise do seu sistema imunológico. Em camundongos heterozigotos para *PTEN*, observou-se um aumento na incidência de tumores, desenvolvimento de hiperplasia linfóide e desordens autoimunes (Di Cristofano *et al.* 1998, Di Cristofano *et al.* 1999). Alguns dos tumores são originados de células T, sugerindo um envolvimento de PTEN no controle da sobrevivência e proliferação de linfócitos T (Susuki *et al.* 1998).

PTEN encontra-se constitutivamente expresso em tecidos normais, contudo em cânceres essa expressão é alterada. A transcrição de *PTEN* é regulada negativamente por SNAIL, EVI1, BMI1, c-JUN, JNK-NFκB e por ID1 (oncogenic factor inhibitor of DNA binding1) que compete com p53 (ativador da transcrição de PTEN) pela ligação ao promotor de *PTEN* (Song *et al.* 2012).

A forma ativa de NOTCH1 regula positivamente a transcrição de HES1 e MYC (Whelan *et al.* 2007, Palomero *et al.* 2006). Ao ativar HES1, NOTCH1 regula negativamente a transcrição de *PTEN* (Palomero *et al.* 2007).

A proteína/atividade de PTEN é também regulada por várias modificações pós-traducionais. A fosforilação da cauda C-terminal da proteína PTEN leva a estabilização da proteína mas com inativação da sua atividade fosfatase (Das *et al.* 2003). Quando a proteína PTEN é fosforilada pela caseína quinase II (CKII), na região carboxi-terminal, esta se torna incapaz de ser recrutada para a membrana celular e assim não antagoniza o efeito da PI3K (Figura 6) (Al-Khoury *et al.* 2005). A proteína PTEN possui 2 sítios de ubiquitinação: K13 e o principal K289. A poli-ubiquitinação leva a proteína a degradação via proteossomo. Por outro lado, o processo de mono-ubiquitinação estabiliza a proteína e é responsável pela sua entrada no núcleo (Trotman *et al.* 2007). A atividade fosfatase de PTEN também é regulada negativamente por oxidação e acetilação (Figura 6) (Song *et al.* 2012).

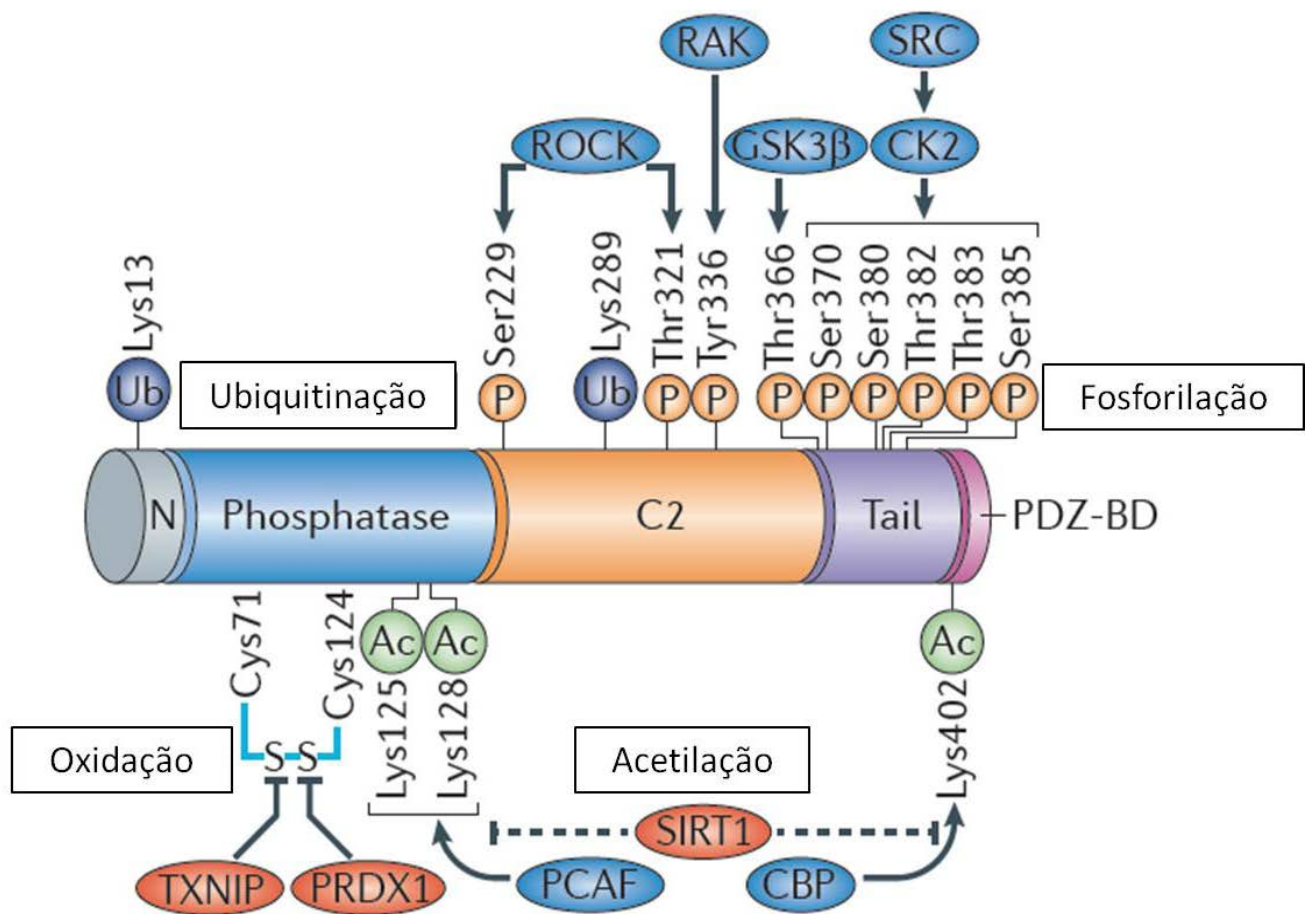


Figura 6: Ilustração do mecanismo de regulação pós-traducional da atividade fosfatase de PTEN mostrando a fosforilação da cauda C-terminal por CK2, GSK3 β , RAK e ROCK. A acetilação, a oxidação e a ubiquitinação da proteína PTEN (Adaptado de Song *et al.* 2012).

O trabalho desta tese teve início no estudo da relação entre alterações de PTEN e a hiperativação da PI3K na LLA-T por Silva *et al.* (2008). Nesse estudo encontramos que 87,5% das LLA-T primárias apresentam hiperativação da via PI3K/AKT, demonstrando a importância desta via na biologia deste câncer. Estando a via do PI3K superativada, levantou-se a hipótese de que o gene *PTEN* estaria sendo suprimido ou mutado nas LLA-T. Assim, amplificamos e sequenciamos todos os éxons do gene *PTEN* para um total de 18 casos de LLA-T de pacientes pediátricos, com primers intrônicos específicos a cada um dos 9 éxons do gene *PTEN*. Encontramos 3 pacientes

(16%) com mutações em *PTEN* sendo *um caso com mutações* nos éxons 1 e 7 concomitantemente e 3 casos apenas no éxon 7 (Silva *et al.* 2008).

Os pacientes com mutações no gene *PTEN* não possuíam expressão proteica de PTEN e consequentemente mostravam ativação constitutiva de PI3K/AKT. Contudo, a maioria das LLA-T apresentavam hiperativação da via Pi3K/AKT na ausência de mutação no gene *PTEN*. Surpreendentemente muito dos casos apresentavam níveis acima dos normais da proteína PTEN que, entretanto, mostrou ser inativada por fosforilação pos-traducional via CK2 (Silva *et al.* 2008). Trabalho para explorar esse fato será apresentado no segundo capítulo da tese.

Desconfiando que as mutações do gene *PTEN*, em alguns casos bialelicas, poderiam ter efeito mais drástico sobre a agressividade da leucemia do que a inativação pos-traducional de PTEN via CK2, empreendemos estudo para avaliar o papel prognóstico das mutações nesse gene em pacientes com LLA-T pediátrica. Esses resultados são apresentados na forma de artigo publicado.

3.2- Resultados - Manuscrito:

Negative prognostic impact of *PTEN* mutation in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia

Patrícia Yoshioka Jotta, Mônica Aparecida Ganazza, Ana Patrícia Silva, Marcos Borato Viana, Márcio José da Silva, Lílian de Jesus Giroto Zambaldi, João Taborda Barata, Silvia Regina Brandalise e José Andres Yunes.

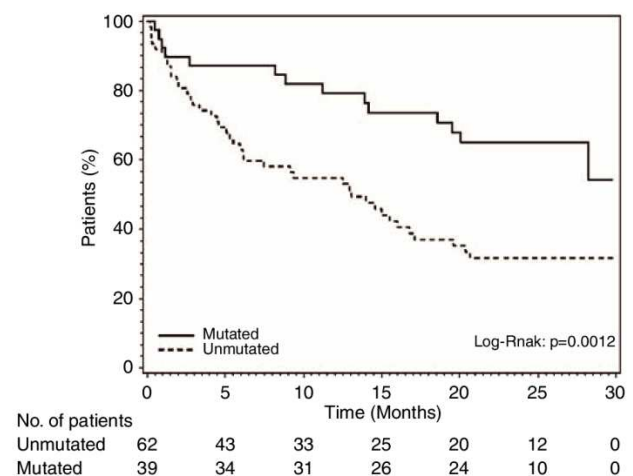


Figure 3 Treatment-free survival (TFS) of patients based on IgV_H mutation status.

either PFS ($P=0.63$) or OS ($P=0.52$), nor did IgV_H mutational status. However, patients with mutated IgV_H had a longer treatment-free survival compared with those with unmutated IgV_H (Figure 3).

The overall response rate of 64% in this cohort of 126 patients with previously untreated B-CLL is comparable to results reported with intravenous fludarabine. Using the same response criteria, Rossi *et al.*² reported an overall response rate of 80% with the same schedule of oral fludarabine in a smaller group of previously untreated B-CLL patients but the proportion of patients in Rai stage III or IV in our study was higher (31% versus 22%) than in the Rossi trial.

This study again confirms that the efficacy and toxicity of oral fludarabine are comparable to that of IV fludarabine given on a similar schedule. Although several randomized trials have confirmed a better overall and complete response rate for the combination of fludarabine and cyclophosphamide compared with fludarabine alone, no differences in the OS were observed.^{7,8} In the British study, the oral formulation of fludarabine was introduced in both fludarabine arms when the drug became available, and differences in response rates between the two routes of administration did not appear significant. Oral fludarabine is an effective treatment for patients with previously untreated B-CLL, with less health resource utilization compared with IV administration. In an older population, the hematologic toxicity of the combination of fludarabine with cyclophosphamide and the absence of a demonstrable survival advantage, may favor initial therapy with single agent fludarabine and deferring combination therapy. In fludarabine-based combination therapies, the oral formulation should be considered an acceptable alternative.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

C Shustik^{1,2}, AR Turner³, P Desjardins⁴, L Fernandez⁵, S Rubin⁶, L Larratt⁷, AMV Duncan², D Rizi², A Sadura¹, L Shepherd¹, D Li¹, L Rassenti⁸ and T Kipps⁸

¹NCIC CTG, Kingston, Ontario, Canada;
²Division of Hematology, McGill University Health Center, Montreal, Quebec, Canada;

³Cross Cancer Institute, Edmonton, Alberta, Canada;

⁴Hopital Charles LeMoyne, Greenfield Park, Quebec, Canada;

⁵Queen Elizabeth II Health Sciences Centre (Victoria Site), Halifax, Nova Scotia, Canada;

⁶The Moncton Hospital, Moncton, New Brunswick, Canada;

⁷University of Alberta Hospital, Edmonton, Alberta, Canada and

⁸Moore's Cancer Center, UCSD, La Jolla, CA, USA

E-mail: chaim.shustik@mcgill.ca

References

- Foran JM, Oscier D, Orchard J, Johnson SA, Tighe M, Cullen MH *et al.* Pharmacokinetic study of single doses of oral fludarabine phosphate in patients with 'low-grade' non-Hodgkin's lymphoma and B-cell chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 1999; **17**: 1574–1579.
- Rossi JF, van HA, de BK, Johnson SA, Bron D, Foussard C *et al.* Efficacy and safety of oral fludarabine phosphate in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2004; **22**: 1260–1267.
- Cheson BD, Bennett JM, Grever M, Kay N, Keating MJ, O'Brien S *et al.* National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood* 1996; **87**: 4990–4997.
- Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L *et al.* Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000; **343**: 1910–1916.
- Dewald GW, Brockman SR, Paternoster SF, Bone ND, O'Fallon JR, Allmer C *et al.* Chromosome anomalies detected by interphase fluorescence *in situ* hybridization: correlation with significant biological features of B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2003; **121**: 287–295.
- Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, Chen L, Keating MJ, Gribben JG *et al.* ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2004; **351**: 893–901.
- Eichhorst BF, Busch R, Hopfinger G, Pasold R, Hensel M, Steinbrecher C *et al.*, the German CLL Study Group. Fludarabine plus cyclophosphamide versus fludarabine alone in first-line therapy of younger patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006; **107**: 885–891.
- Catovsky D, Richards S, Matutes E, Oscier D, Dyer M, Bezares R *et al.* Assessment of fludarabine plus cyclophosphamide for patients with chronic lymphocytic leukaemia (the LRF CLL4 Trial): a randomised controlled trial. *Lancet* 2007; **370**: 230–239.

Negative prognostic impact of *PTEN* mutation in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia

Leukemia (2010) **24**, 239–242; doi:10.1038/leu.2009.209;
published online 15 October 2009

We have recently shown that constitutive activation of PI3K/Akt signaling pathway is a very common event in pediatric

T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) and is critical for leukemic cell viability. PI3K/Akt pathway hyperactivation appears to result mainly from post-translational inactivation of the phosphatase and tensin homolog (PTEN) protein, which is the main negative regulator of PI3K/Akt pathway.¹ However, a

relatively small but significant subset of newly diagnosed T-ALL patient samples are known to present inactivating *PTEN* gene mutations.^{1–5} *PTEN* mutation may collaborate with *PTEN* post-translational inactivation to maximize *PTEN* functional deficiency, thus contributing to increased PI3K/Akt activation and finally to leukemia resistance to chemotherapy. In fact, the occurrence of *PTEN* mutation/deletion is highly frequent in human T-ALL cell lines derived from relapsed patients. Moreover, *PTEN* mutation was reported to occur in 2 of 35 relapsed T-ALL as a secondary event during disease progression.³ As discussed below, the clinical relevance of *PTEN* mutations in pediatric T-ALL is available for only a limited number of patients^{4,6} and should be analyzed with caution. Here, we report the prognostic impact of *PTEN* exon 7 mutations in a larger series of consecutive pediatric ALL patients treated in a single institution. Our results favor the notion that *PTEN* mutations can have a prognostic impact in pediatric T-ALL.

Bone marrow samples were obtained at diagnosis from 63 and 71 consecutive children (>1 month and <18, except for a 19- and 23-year-old T-ALL patients) with previously untreated T-ALL and precursor B-cell ALL, respectively. The group of T-ALL patients had a partial overlap with those we previously reported in the context of the post-translational inactivation of *PTEN* protein (18/63).¹ Patients were registered at Boldrini Children's Center between 2000 and 2008, and were treated according to the Brazilian GBTLI ALL-99 Childhood Treatment protocol.⁷ Three T-ALL patients received corticosteroid before diagnosis but all had >50% blasts in diagnostic bone marrow aspirates and accordingly were included in the study. One patient had no DNA available (final *n*=62). Median follow-up was 4.4 years (interquartile range 2.4–6.8 years) for patients still alive and 1.4 years for those who died (interquartile range 0.3–1.8 years). The study was approved by the Research Ethics Committee from both Centro Infantil Boldrini and State University of Campinas.

Several independent studies have previously shown that *PTEN* mutations in primary T-ALL occur almost exclusively in exon 7.^{1–4} In this study, we screened for mutations in exon 7 and also exon 1, because we previously identified one patient

harboring a mutation in that exon in conjunction with exon 7 mutation.¹ The *PTEN* exon 1 and 7 coding and flanking intronic sequences were amplified by PCR¹ and polymorphisms were screened by a method based on homo–heteroduplex formation. To validate the homo–heteroduplex methodology, all 62 PCR products of exon 7 from T-ALL samples were sequenced. We found *PTEN* exon 7 mutations in 11 out of 62 T-ALL (17.7%, CI: 8.2–27.2%), but in none of 71 precursor B-cell ALL patients. All T-ALL samples harboring *PTEN* mutations by direct DNA sequencing analysis were correctly classified by the simplified homo–heteroduplex technique. Even single nucleotide differences were also detected by the homo/heteroduplex analysis. We did not find any additional T-ALL patients presenting exon 1 mutations.

Although there is evidence for constitutive activation of PI3K/Akt pathway in precursor B-cell ALL our results suggest that *PTEN* mutations (at least affecting exon 1 and 7) are absent or rare in the most common type of childhood ALL. In contrast, they represent a relatively frequent genetic abnormality in childhood T-ALL, occurring in approximately 18% of the cases. Other studies found *PTEN*-inactivating mutations in 5% (2/38),² 8% (9/111),³ and 27% (12/44)⁴ of T-ALL samples. The limited number of samples analyzed and/or different methodologies may explain these discrepancies. Also, our PCR methodology did not allow for the detection of putative allele/exon deletions (except homozygous deletions), which were recently found to occur in 4% (2/47⁴ and 3/72⁵) of T-ALL samples. Recently, Larson Gedman *et al.*⁶ sequenced cDNA samples and found far higher frequency of *PTEN* mutations (63%, 27/43) that, in contrast to previous studies,^{2–4} extended to most *PTEN* exons. However, many of the proposed cDNA mutations correspond to the sequence of the *PTEN* pseudogene, which is known to be transcribed. Therefore, the prevalence and range of *PTEN* gene alterations may have been overestimated.

PTEN mutations clustered in a narrow region of exon 7 and resulted in predicted C-terminal *PTEN* protein truncations in all but one of the cases. Although these mutations preserve the phosphatase domain of the protein, *PTEN* proteins lacking their C-terminal domain are reported to be rapidly degraded.⁸

Table 1 Exon 7 *PTEN* mutations in pediatric T-ALL patients^a

Patient	<i>PTEN</i> exon	Nucleotide change	Predicted protein change
<i>Monoallelic mutations</i>			
428	7	701–729 het_del(GGGAAGACAAGTTCATGTACTTTGAGTTC)	Frameshift stop at 242 234–241-ins(PSAVTCVW)
501 ^b	7	697–706 het_del(ACGACGGGAA)	Frameshift stop at 252 233–251 ins(TSSCTLSSLSRYLCWISK)
509	7	738–739 het_ins(CC)	Frameshift stop at 256 247–255 ins(RYLCVWISK)
595	7	721–727 het_ins(CTTG GCC)	Frameshift stop at 257 241–256 ins(LGLSSLSRYLCWISK)
691 ^b	7	721–722 het_del(TT)	Frameshift stop at 242 233–241 ins(TTGRQVHVL)
1001	7	697 het_ins(A)	246–247 ins(PG)
1130	7	738–743 het_ins(GGGCCC)	Frameshift stop at 242 233–241 ins(PSGRQVHVL)
	7	698–700 het_ins(CCT)	
	7	698–699 het_del(GA)	
<i>Biallelic mutations</i>			
1004	7	701–702 het_ins(AA)	Frameshift stop at 256 234–255 ins(QGKTSSCTLSSLSRYLCWIK)
	7	697–700 het_del(CGAC)	Frameshift stop at 244
	7	697–707 het_ins(TGCAGTGGTCA)	233–243 ins(CCGPGRQVHVL)

^aData is presented for 8 out of the 11 T-ALL patients harboring *PTEN* mutations, included in this study. Description of *PTEN* mutations for the three remaining T-ALL patients can be found elsewhere.¹ het, heterozygous; ins, insertion; del, deletion.

^bPatients belonging to the Low-Risk classification of GBTLI ALL-99,⁷ thus excluded from survival analysis of Figure 1.

Table 2 Association of *PTEN* mutations with clinical and biological variables^a

Patient characteristics	Mutant <i>PTEN</i> (n) ^b	Wild type <i>PTEN</i> (n)	P-value ^c
Gender			
Male	9	38	1.0
Female	3	12	
Age			
≥ 1 and < 9 years	7	23	0.53
≥ 9 years	5	27	
WBC count at diagnosis ^d			
< 50 000/mm ³	3	13	1.0
≥ 50 000/mm ³	9	37	
Extramedullary involvement			
Yes	6	18	0.32
No	5	31	
WBC at day 7 of treatment			
< 5000/mm ³	8	38	1.0
≥ 5000/mm ³	2	11	
Risk group			
High risk	10	45	0.61
Low risk	2	5	
CD10 (CALLA)			
Positive	1	20	0.044
Absent	11	29	
Hematological remission at day 28 (end of induction)			
Yes	7	43	0.044
No	5	7	
Hematological remission at any day			
Yes	10	46	0.33
No	2	4	

^aNone of these clinical variables affected patients' survival, except for the presence of more than 5% blasts in BM of day 28, and absence of hematological remission, which were associated with lower overall survival (both $P < 0.001$).

^bAll 11 patients with exon 7 mutation plus the one with the 10q23–26 rearrangement.

^cFisher's exact test.

^dWBC indicates white blood cell.

Of the 11 patients with *PTEN* mutations, two had homozygous *PTEN* mutations, one had both alleles affected by distinct exon 7 mutations and one had both exon 1 and 7 mutations (Table 1).¹ *PTEN* protein expression was abrogated or strikingly reduced (data not shown) in these four patients, herein classified as having biallelic *PTEN* abnormalities.

In addition, one T-ALL patient had a t(3;10)(p21;q23–26) chromosomal rearrangement (data not shown). *PTEN* gene is known to be located on chromosome 10q23.3. For this patient, all exons were sequenced, but no evidence of DNA mutations was found. Notwithstanding, *PTEN* protein was absent in western blot assays (data not shown) and so this patient was considered to have *PTEN* abnormalities in both alleles, resulting in a 'silenced' gene, functionally similar to those four harboring biallelic *PTEN* abnormalities.

As shown in Table 1, all but one of the patients harboring *PTEN* alterations were CALLA negative ($P = 0.044$). Importantly, four out of the five patients (80%) harboring biallelic *PTEN* abnormalities failed to reach remission at the end of the induction therapy, in contrast to only 8 in 57 (14%) with the wild type or with monoallelic mutations ($P = 0.004$; Fisher's

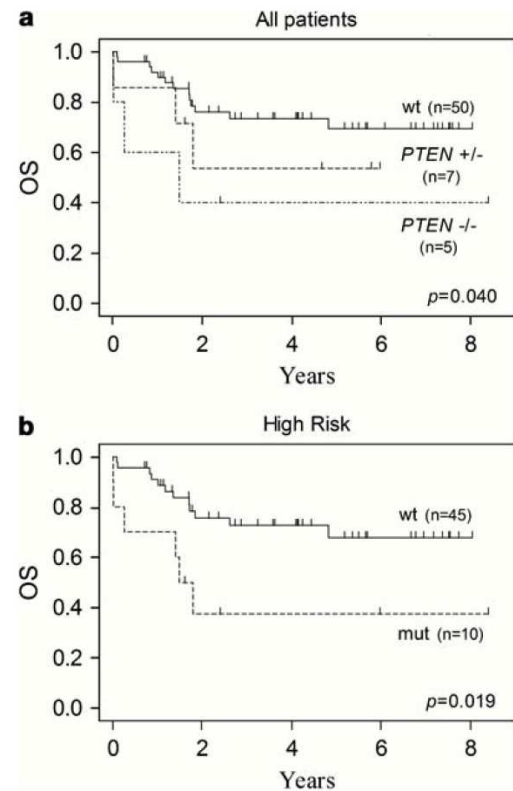


Figure 1 Effect of *PTEN* mutational status on long-term survival of pediatric T-ALL patients. (a) Overall survival curves for all patients ($n = 62$) divided into three groups according to *PTEN* status: wt, wild type; *PTEN* +/–, heterozygous monoallelic mutation; *PTEN* –/–, homozygous or biallelic *PTEN* mutation. Curves were analyzed with the log-rank test for trend. The curves of EFS are similar to those of OS but the difference is not statistically significant ($P = 0.10$, data not shown). (b) Overall survival curves for high-risk T-ALL patients ($n = 55$), according to having (mut) or not (wt) a *PTEN* abnormality. The criteria used for the classification of patients into the high risk group are presented elsewhere.⁷

test). In addition, all of them had $> 100\,000/\mu\text{l}$ WBC at diagnosis, contrary to only 28 of 57 (49%) of the patients in the other two groups ($P = 0.055$; Fisher's test). No other association could be found between *PTEN* status and other clinical and biological variables at diagnosis (Table 2).

Survival analysis indicated that patients harboring any *PTEN* gene alteration ($n = 12$) had a tendency toward inferior overall survival (OS 48.6 ± 14.8 versus $69.4 \pm 7.4\%$, $P = 0.07$) and event-free survival (EFS 48.6 ± 14.8 versus $65.2 \pm 7.7\%$, $P = 0.15$) than those without this genetic lesion. Patients with a 'silenced' *PTEN* gene ($n = 5$) had the lowest estimated probability of surviving ($40 \pm 21.9\%$), whereas patients with no detected abnormality ($n = 50$) had the highest ($69.4 \pm 7.4\%$), and those harboring monoallelic mutations ($n = 7$) displayed an intermediate value ($53.6 \pm 20.1\%$; $P = 0.04$, log-rank test for trend; Figure 1a).

The majority of patients ($n = 55$) was classified in the high-risk group and was treated more intensively than those in the low-risk group ($n = 7$). When separate analysis for the high-risk group was undertaken, *PTEN* mutations were significantly associated with lower OS (37.5 ± 16.1 versus $67.9 \pm 8.1\%$; $P = 0.019$; Figure 1b) and EFS (37.5 ± 16.1 versus $63.1 \pm 8.5\%$; $P = 0.052$).

Our results contradict very recent findings by Larson Gedman *et al.*⁶, which reported that *PTEN* mutations had no prognostic significance in pediatric T-ALL.⁶ However, these authors may have overestimated (~ 3 -fold) the number of patients with *PTEN*

mutations by having sequenced the *PTEN* pseudogene. Gutierrez *et al.*⁴ reported that genetic alterations in the PTEN–PI3K–AKT pathway, including *PTEN* truncating mutations ($n = 12$), did not predict event-free survival. In contrast, the same authors reported that *PTEN* deletions, as determined by FISH analysis, were significantly associated with early treatment failure in three out of four patients and may contribute to increased resistance to induction chemotherapy. This observation is compatible with our findings regarding patients harboring biallelic *PTEN* abnormalities. The apparent discrepancies between these studies regarding the prognostic impact of exon 7 *PTEN* mutations may be attributed to the small number of patients analyzed or to differences in the treatment protocols. Besides, *PTEN* post-translational inactivation, which is very frequent in primary T-ALL but does not occur in all patients to the same degree,¹ might act as a confounding factor in the different studies, which focus strictly on *PTEN* gene lesions. Importantly, our current observations suggest that T-ALL patients harboring exon 7 *PTEN* mutations may be at increased risk of relapse.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; 08/10034-1), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; 401122/2005-0) and Fundação para a Ciência e a Tecnologia (POCI-PPCDT/SAU-OBS/58913 and PTDC/SAU-OB/69974). PYJ, MAG and MBV have FAPESP, CAPES and CNPq scholarships, respectively. AS has FCT-SFRH PhD fellowships.

PY Jotta¹, MA Ganazza¹, A Silva², MB Viana³, MJ da Silva⁴, LJG Zambaldi¹, JT Barata², SR Brandalise^{1,5} and JA Yunes¹
¹Centro Infantil Boldrini, Laboratório de Biologia Molecular, Campinas, São Paulo, Brazil;

²Cancer Biology Unit, Instituto de Medicina Molecular, Lisbon University Medical School, Lisboa, Portugal;

³Depto. de Pediatria, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil;

⁴Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil and

⁵Depto. de Pediatria, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil
 E-mail: andres@boldrini.org.br

References

- 1 Silva A, Yunes JA, Cardoso BA, Martins LR, Jotta PY, Abecasis M *et al.* PTEN posttranslational inactivation and hyperactivation of the PI3K/Akt pathway sustain primary T cell leukemia viability. *J Clin Invest* 2008; **118**: 3762–3774.
- 2 Maser RS, Choudhury B, Campbell PJ, Feng B, Wong KK, Protopopov A *et al.* Chromosomally unstable mouse tumours have genomic alterations similar to diverse human cancers. *Nature* 2007; **447**: 966–971.
- 3 Palomero T, Sulis ML, Cortina M, Real PJ, Barnes K, Ciofani M *et al.* Mutational loss of PTEN induces resistance to NOTCH1 inhibition in T-cell leukemia. *Nat Med* 2007; **13**: 1203–1210.
- 4 Gutierrez A, Sanda T, Grebliunaite R, Carracedo A, Salmena L, Ahn Y *et al.* High frequency of PTEN, PI3K and AKT abnormalities in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2009; **114**: 647–650.
- 5 Remke M, Pfister S, Kox C, Toedt G, Becker N, Benner A *et al.* High-resolution genomic profiling of childhood T-ALL reveals frequent copy-number alterations affecting the TGF- β and PI3K-AKT pathways and deletions at 6q15-16.1 as a genomic marker for unfavorable early treatment response. *Blood* 2009; **114**: 1053–1062.
- 6 Larson GA, Chen Q, Kugel DS, Ge Y, Lafiura K, Haska CL *et al.* The impact of NOTCH1, FBW7 and PTEN mutations on prognosis and downstream signaling in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *Leukemia* 2009; **23**: 1417–1425.
- 7 Cortez MA, Scrideli CA, Yunes JA, Valera ET, Toledo S, Pavoni-Ferreira PCB *et al.* mRNA expression profile of multidrug resistance genes in childhood acute lymphoblastic leukemia. Low expression levels associated with a higher risk of toxic death. *Pediatric Blood Cancer* 2009; **53**: 996–1004.
- 8 Georgescu MM, Kirsch KH, Akagi T, Shishido T, Hanafusa H. The tumor-suppressor activity of PTEN is regulated by its carboxyl-terminal region. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 10182–10187.

Novel *RUNX1* mutations in familial platelet disorder with enhanced risk for acute myeloid leukemia: clues for improved identification of the FPD/AML syndrome

Leukemia (2010) **24**, 242–246; doi:10.1038/leu.2009.210;
 published online 15 October 2009

Familial aggregation of leukemia is rare. In some families, however, a clear segregation of the predisposition to leukemia is observed. A prime example is familial platelet disorder in which the affected individuals exhibit an enhanced risk to develop acute myeloid leukemia (FPD/AML). This condition is characterized by thrombocytopenia, platelet dysfunction and a 35% lifetime risk for developing leukemia.¹

FPD/AML is caused by germline mutations in *RUNX1*.² The encoded RUNX1 protein contains a highly conserved Runt domain, which is involved in both DNA binding and heterodimerization with its partner protein, CBF β . Together these proteins form a transcription factor complex that is widely

expressed in various hematopoietic lineages and regulates the expression of several critical genes.³

Since the identification of *RUNX1* as the causative gene in FPD/AML,² only 25 mutation-positive families have been reported in the literature, which suggests that FPD/AML is a relatively rare disorder. An additional explanation may be that this disorder is underdiagnosed, as was recently suggested by Owen *et al.*,¹ who identified *RUNX1* mutations in 50% (5/10) of families with more than one first degree relative with myelodysplastic syndrome (MDS) and/or AML. They concluded that FPD/AML may be more prevalent than recognized earlier.

Here, we present two families with a molecularly confirmed diagnosis of FPD/AML. On the basis of our data we conclude that the FPD/AML syndrome is not only easily overlooked clinically, but the molecular defect(s) causing the phenotype may equally well be overlooked by routine molecular analyses.

3.3- Discussão

Em nosso estudo anterior (Silva *et al.* 2008), encontramos uma prevalência de alterações genéticas no éxon 7 do *PTEN*. Nesse estudo nós verificamos a incidência e o valor prognóstico das mutações de *PTEN* em 62 casos consecutivos de LLA-T pediátrica tratados em uma única instituição. Também, investigamos a ocorrência de mutações nos éxons 1 e 7 do *PTEN* em 71 casos consecutivos de LLA-B precursora. A incidência de mutações nesses éxons do *PTEN* parece estar restrita as LLA-T, com uma prevalência de 18%.

Durante esse estudo chamou-nos a atenção a alta frequência de envolvimento do éxon 7 nas mutações do *PTEN* e a maioria das mutações serem inserções e deleções. Outros trabalhos (Maser *et al.* 2007; Palomero *et al.* 2007; Gutierrez *et al.* 2009) também descreveram mutações no éxon 7 do *PTEN* em LLA-T pediátrica (Figura 7). Esse *hot spot* de mutações em *PTEN* poderia ser explicado pela presença de um sítio críptico para a recombinase RAG, responsável pelos rearranjos V(D)J. Estamos realizando estudos para verificar essa hipótese.

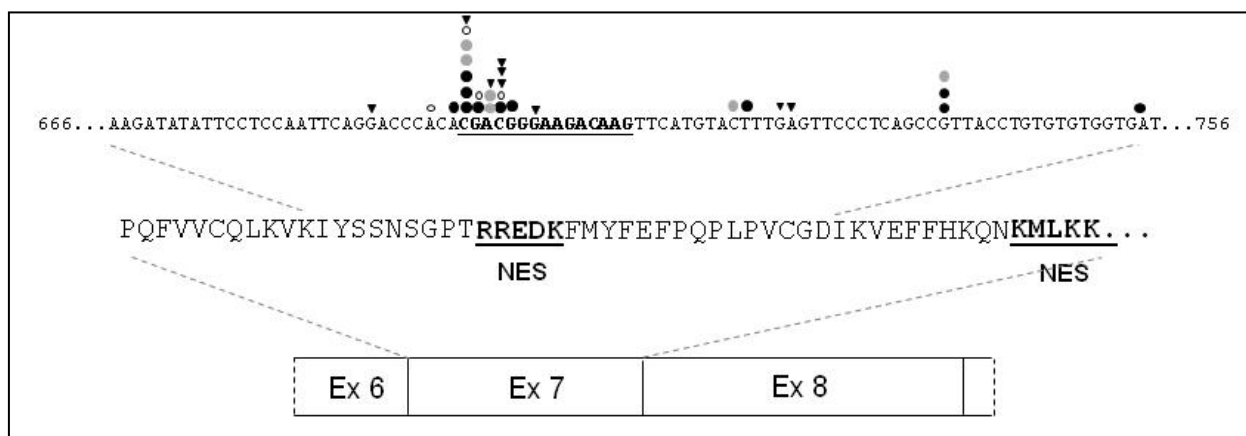


Figura 7: Representação esquemática de todas as mutações conhecidas no gene *PTEN* em LLA-T pediátrica. Círculos pretos → nosso estudo; Círculos brancos → Maser *et al.* Nature 2006 ; Círculos Cinzas → Palomero *et al.* Nature medicine 2007 e triângulos pretos → Gutierrez *et al.* Blood 2009. Destacados estão os possíveis motivos de exclusão nuclear (NES).

Devido ao importante papel da via de sinalização PI3K/AKT na sobrevivência e resistência a quimioterapia das células leucêmicas, avaliamos o valor prognóstico das mutações de LLA-T. Encontramos que pacientes *PTEN* mutados possuem pior sobrevida em comparação aos pacientes sem essa alteração genética, principalmente o grupo classificado como LLA-T alto risco (89% dos casos estudados), em função da idade (>10 anos) e leucometria ao diagnóstico. A presença das mutações em *PTEN* mostraram-se associadas à ausência de expressão de CD10, que é mais comum nas LLA-T de fenótipo mais imaturo, conhecidas como ETP (early T phenotype), e que são de pior prognóstico (Coustan-Smith *et al.* 2009). Aliado a isso avaliamos a relação entre mutações em *PTEN* e os dados clínicos dos pacientes estudados e encontramos relação significativa entre a presença da mutação e a falha em alcançar a remissão hematológica após a fase de indução do tratamento (D28). Esses resultados indicam que as mutações em *PTEN* estariam relacionadas a resistência ao tratamento, mesmo com a intensificação da terapia usada para o grupo de alto risco.

Além disso, pacientes que apresentavam mutações homozigotas em *PTEN* (bialélica) possuem pior resposta clínica comparados as alterações monoalélicas. Camundongos *PTEN* knockout mostraram que o gene *PTEN* é haploinsuficiente, ou seja a perda de uma cópia do gene aumenta a atividade tumoral (Di Cristofano *et al.* 1999). Podemos inferir que a resposta clínica dos pacientes com LLA-T está relacionada a atividade fosfatase de *PTEN* (Silva *et al.* 2008), esse efeito foi descrito em outros tumores (Sansal & Sellers 2004). Dessa maneira, supomos que pacientes homozigotos (bialélico) *PTEN* mutado apresentariam menor atividade da proteína em relação aos pacientes com alterações monoalélicas.

Nossos resultados contradizem outros estudos da literatura publicados por Larson Gedman *et al.* (Leukemia 2009) e Gutierrez *et al.* (Blood 2009). Em nossa opinião, o trabalho publicado por Larson Gedman *et al.*, o qual não encontrou valor prognóstico significativo nas alterações genéticas no gene *PTEN*, pode ter superestimado o número de pacientes com mutações por ter sequenciado o pseudogene de *PTEN* (Figura 8).

Gutierrez *et al.* (2009) mostrou que pacientes com deleções citogenéticas de *PTEN* (agrupados bialélica e monoalélica juntos) apresentaram falha precoce na resposta ao

tratamento em comparação aos pacientes com *PTEN* selvagem ou com mutações que truncam a proteína no domínio fosfatase. Esses autores sugerem que as mutações em *PTEN*, que ocorrem exclusivamente no éxon 7 e preservam o domínio fosfatase não afetam a função de PTEN como as deleções. Contudo, a literatura tem mostrado que a proteína PTEN sem o domínio C2 reduz sua ligação a membrana, importante para sua atividade fosfatase e degrada mais rápido (Das *et al.* 2003). De fato, em nosso estudo anterior (Silva *et al.* 2008), pacientes *PTEN* mutados apresentavam menor quantidade de proteína PTEN e hiperativação da via PI3K/AKT, o que depõe em contra a hipótese levantada por Gutierrez *et al.* (2009)

Chung *et al.* (2005) demonstrou a existência de motivos de localização nuclear na região C2 de PTEN que seria responsável pela entrada da proteína no núcleo da célula (Figura 6). Contudo, Gil *et al.* (2006) mostrou que esses motivos estão relacionados a exclusão nuclear da proteína, pois mutações nessa região levam ao acúmulo de PTEN no núcleo. A maioria de nossos pacientes apresentam mutações que levam a mudança no *frame* de leitura, ocasionando um *stop códon* precoce. Dessa maneira sugerindo que a proteína originada não apresentaria os motivos de exclusão nuclear (Figura 7). O recrutamento de PTEN para o núcleo reduz sua habilidade em antagonizar PI3K (Lindsay *et al.* 2006). Dessa maneira, facilitaria a hiperativação da via PI3K/AKT, mesmo sem ter havido alteração de seu domínio fosfatase.

Por outro lado, a proteína PTEN possui 2 sítios de ubiquitinação K13 e o principal K289. O processo de mono-ubiquitinação é responsável pela entrada da proteína PTEN no núcleo. A proteína PTEN mutada em K289E acumula no citoplasma se comparada a proteína selvagem que possui distribuição equilibrada entre o núcleo e o citoplasma (Trotman *et al.* 2007 e Song *et al.* 2008). As mutações descritas não possuem o principal sítio de ubiquitinização o que levaria ao acúmulo de PTEN no citoplasma (Song *et al.* 2008).

Estamos realizando estudos para verificar a função da proteína PTEN mutada e as possíveis alterações na localização subcelular da mesma e o seu papel na LLA-T.

Importante salientar que o número de pacientes analisados por Larson Gedman *et al.* e Gutierrez *et al.* foi pequeno (n=44) comparado ao do nosso estudo (62). As

diferenças nos protocolos de tratamento podem ter contribuído para as discrepâncias encontradas entre nossos trabalhos. Para finalizar, nós especulamos em nosso artigo que a inativação pós-traducional de PTEN (muito frequente em LLA-T, mas não ocorre da mesma maneira em todos os pacientes) pode atuar como um fator a atrapalhar as análises em trabalhos que apenas levam em consideração as lesões genéticas do gene *PTEN*.

Clappier *et al.* (2011) propôs que a recaída emerge de subclones leucêmicos que adquirem nova alteração em oncogenes e genes supressores de tumor. A perda/mutação de *PTEN* foi descrita como possível responsável pela seleção clonal e ganho de malignidade das células leucêmicas da recaída e dessa maneira para resistência ao tratamento. Esses dados corroboram nossos resultados, em que pacientes *PTEN* mutados apresentaram menor resposta ao tratamento.

Encontramos também relação significativa entre a ausência de CD10 (CALLA) e mutações em *PTEN*. CD10 ou CALLA (antígeno comum da LLA) é expresso normalmente em células progenitoras linfóides e neutrófilos, sua presença apresenta uma tendência a melhor prognóstico nas LLA-B. Contudo, essa tendência não foi observada em LLA-T (Consolini *et al.* 1998). Assim sugerimos o uso de mutações em *PTEN* como mais um marcador de pior prognóstico da LLA-T. É possível alvo de desenvolvimentos de novas drogas. Contudo, como o número de pacientes *PTEN* mutados é pequeno (N=12) as análises devem ser consideradas com cautela.

ptn ATGACAGCCATCATCAAAGAGATCGTTAGCAGAAACAAAAGGAGATATCAAGAGGATGGA 60
pseudogene AGGACAGCCATCATCAAAGAGATCGTTAGCAGAAACAAAAGGAGATATCAAGAGGATGGA 60

LarsonGedman G T

ptn TTCGACTTAGACTTGACCTATATTATCCAAACATTATTGCTATGGGATTTCCTGCAGAA 120
pseudogene TTCGACTTAGACTTGACCTATATTATCTAAACATTATTGCTATGGGATTTCCTGCAGAA 120

LarsonGedman G T T

ptn AGACTTGAAGGCGTATACAGGAACAATATTGATGATGTAGTAAGGTTTTTGGATTCAAAG 180
pseudogene AGACTTGAAGGCGTATACAGGAACAATATTGATGATGTAGTAAGGTTTTTGGATTCAAAG 180

ptn CATAAAAACCATTACAAGATATACAATCTTTGTGCTGAAAGACATTATGACACCGCCAAA 240
pseudogene CATAAAAACCATTACAAGATACACAATCTTTGTGCTGAAAGACATTATGACACCGCCAAA 240

LarsonGedman C

ptn TTTAATTGCAGAGTTGCACAATATCCTTTTGAAGACCATAACCCACCACAGCTAGAACTT 300
pseudogene TCTAATTACAGAGTTGCACAATATCCTTTTGAAGACCATAACCCACCACAGCTAGAACTT 300
* * * * *

LarsonGedman C A G

ptn ATCAAACCCCTTTTGTGAAGATCTTGACCAATGGCTAAGTGAAGATGACAATCATGTTGCA 360
pseudogene ATCAAACCCCTTTTGTGAAGATCTTGACCAATGGCTAAGTGAAGATGACAATCATGTTGCA 360

ptn GCAATTCAGTGTAAAGCTGAAAGGGACGAAGTGGTGTAAATGATATGTGCATATTTATTA 420
pseudogene GCAATTCAGTGTAAAGCTGAAAGGGACGAAGTGGTGTAAATGATTTATGCATATTTATTA 420

LarsonGedman A T A

ptn CATCGGGGCAAATTTTAAAGGCACAAGAGGCCCTAGATTTCTATGGGGAAGTAAAGACC 480
pseudogene CATCGGGGCAAATTTTAAAGGCACAAGAGGCCCTAGATTTCTATGGGGAAGTAAAGACC 480

ptn AGAGACAAAAGGGAGTAACTATTTCCAGTCAGAGGCGCTATGTGTATTATATAGCTAC 540
pseudogene AGAGACAAAAGGGAGTAACTATTTCCAGTCAGAGGCGCTATGTGTATTATATAGCTAC 540

LarsonGedman T C C

ptn CTGTAAAGAATCATCTGGATTATAGACCACTGGCACTGTTGTTTCACAAGATGATGTTT 600
pseudogene CTGTAAAGAATCATCTGGATTATAGACCACTGGCACTGTTGTTTCACAAGATGATGTTT 600
*** * * * * *

LarsonGedman A GG G C

!→ exon 7

ptn GAAACTATTCGAATGTTTCAGTGGCGGAAGTTCGAATCCTCAGTTTGTGGTCTGCCAGTA 660
pseudogene GAAACTATTCGAATGTTTCAGTGGCGGAAGTTCGAATCCTCAGTTTGTGGTCTGCCAGTA 660

ptn AAGGTGAAGATATATTCTCCCAATTCAGGACCCACACGACGGGAAGACAAGTTTCATGTAC 720
pseudogene AAGGTGAAGATGATTCTCCCAATTCAGGACCCACACGATGGGAGGACAAGTTTCATGTAT 720

LarsonGedman G GA A G T
T T

ptn TTTGAGTTCCTCAGCCGTTACCTGTGTGTGGTGATATCAAAGTAGAGTTCTTCCACAAA 780
pseudogene TTTGAGTTCCTCAGCCGTTACCTGTGTGTGGTGATATCAAAGTAGAGTTCTTCCACAAA 780

LarsonGedman T C AA C G AGA AT

Exon 7 →!

ptn CAGAACAAGATGCTAAAAAAGGACAAAATGTTTCACTTTTGGGTAAATACATTCTTCATA 840
pseudogene CAGAACAAGATGCTAAAAAAGGACAAAATGTTTCACTTTTGGGTAAATACATTCTTCATA 840

```

pten      CCAGGACCAGAGGAAACCTCAGAAAAAGTAGAAAATGGAAGTCTATGTGATCAAGAAATC 900
pseudogene CCAGGACCAGAGGAAACCTCAGAAAAAGTAGAAAATGGAAGTCTATGTGATCAAGAAATT 900
          *****

LarsonGedman      C GG G T
LarsonGedman      C

pten      GATAGCATTTGCAGTATAGAGCGTGCAGATAATGACAAGGAATATCTAGTACTTACTTTA 960
pseudogene GATAGCATTTGCAGTATAGAGCGTGCAGATAATGACAAGGAGTATCTAGTACTTACTTTA 960
          *****

LarsonGedman      G A

pten      ACAAAAATGATCTTGACAAAGCAAATAAAGACAAAGCCAACCGATACTTTTCTCCAAAT 1020
pseudogene ACAAAAATGATCTTGACAAAGCAAATAAAGACAAAGCCAACCGATACTTTTCTCCAAAT 1020
          *****

pten      TTTAAGGTGAAGCTGTACTTCACAAAAACAGTAGAGGAGCCGTCAAATCCAGAGGCTAGC 1080
pseudogene TTTAAGGTGAAGCTGTACTTCACAAAAACAGTAGAGGAGCCGTCAAATCCAGAGGCTAGC 1080
          *****

pten      AGTTCAACTTCTGTAAACACCAGATGTTAGTGACAATGAACCTGATCATTATAGATATTCT 1140
pseudogene AGTTCAACTTCTGTAAACACCAGATGTTAGTGACAATGAACCTGATCATTATAGATATTCT 1140
          *****

pten      GACACCACTGACTCTGATCCAGAGAATGAACCTTTTGATGAAGATCAGCATACACAAATT 1200
pseudogene GACACCACTGACTCTGATCCAGAGAATGAACCTTTTGATGAAGATCAGCATACACAAATT 1200
          *****

pten      ACAAAAGTCTGA--- 1212
pseudogene ACAAAAGTCTGAATT 1215
          *****

```

Figura 8: Alinhamento de *PTEN* e seu pseudogene (AF023139) com todas as mutações pontuais descritas por Larson Gedman *et al.* Deleções e inserções não foram mostradas. Coincidências entre mutações de *PTEN* descritas por Larson Gedman *et al.* e a sequência do pseudogene de *PTEN* estão grafadas em amarelo. O início do éxon 7 está destacado (*hot spot* de mutações de *PTEN* em LLA-T).

4- Capítulo II: Mutações de *NOTCH1*, expressão de *PTEN* e novas drogas contra a LLA-T

4.1- Introdução - NOTCH1

NOTCH1 atua diretamente controlando o crescimento celular e o metabolismo. Palomero *et al* (2006) mostrou que NOTCH1 regula a proliferação celular da LLA-T diretamente e através da regulação da transcrição de *c-MYC*. MYC e HES1 são fatores de transcrição diretamente regulados por NOTCH1 os quais atuam no promotor do gene *PTEN*, sendo que o primeiro positivamente e o segundo negativamente (Palomero & Ferrando 2008). Contudo a sinalização via HES1 prevalece, dessa maneira NOTCH1 regula negativamente o promotor do gene PTEN (Palomero *et al.* 2006)

O gene NOTCH1 possui um importante papel na determinação do comprometimento dos linfócitos imaturos com a linhagem T (Radtke *et al.* 1999) e a manutenção deste comprometimento durante o desenvolvimento dos linfócitos T no timo, principalmente no estágio DN (CD4-/CD8-) (Schmitt *et al.* 2004). Trabalhos anteriores demonstraram que mutações nesse gene podem desencadear LLA-T em camundongos (Pear *et al.* 1996).

NOTCH1 sofre uma primeira clivagem no complexo de Golgi a caminho da superfície celular pela protease furin-like. Quando os ligantes Delta-Serrate-Lag2 (DSL) ativam a porção extracelular de NOTCH1 (NEC) iniciam uma cascata de clivagens na região transmembrana (NTM). A última clivagem por γ -secretase libera a porção intracelular de NOTCH1 (ICN), a qual atua na regulação transcricional no núcleo (Figura 9) (Struhl & Adachi 1998; Artavanis-Tsakomas *et al.* 1999, Dumortier *et al.* 2006).

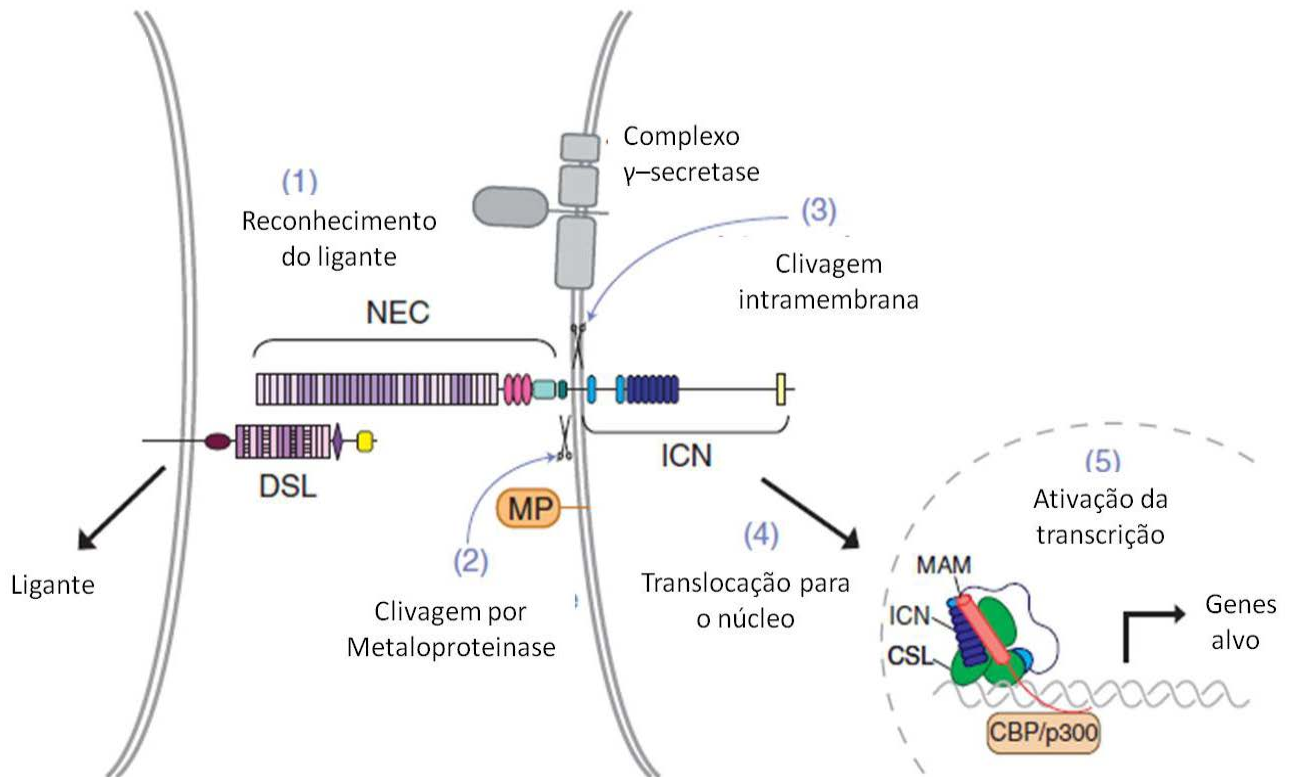


Figura 9: Ilustração da ativação de NOTCH 1. NOTCH1 sofre 2 clivagens após sua ligação com fatores de crescimento e entra no núcleo e ativa a transcrição (Adaptado de Gordon W R *et al.* 2008).

A forma madura do receptor NOTCH1 consiste em uma glicoproteína heterodimerica de classe I, formada após clivagem no domínio HD da proteína precursora (Figura 10) (Sulis, *et al.* 2008). NOTCH1 possui um domínio de regulação negativa PEST na região C-terminal. O domínio PEST regula o *turnover* de NOTCH1 e quando deletado, aumenta a estabilidade da proteína truncada. Weng *et al.* (2004) encontrou 56,2% das LLA-T analisadas com mutações nas regiões correspondentes a domínio HD (éxons 26 e 27) e ao domínio PEST (éxon34), sendo dessa maneira mutações ativadoras. No primeiro caso as mutações levariam a uma clivagem independente de ligante da proteína precursora e no segundo caso a forma ativa da proteína não seria degradada via FBXW7-ubiquitinação (Thompson *et al.* 2007). Mutações ativadoras de NOTCH1 em LLA-T pediátrica foram associadas a bom

prognóstico, principalmente quando combinadas com mutações de perda de função de FBXW7 (Asnafi *et al.* 2005).

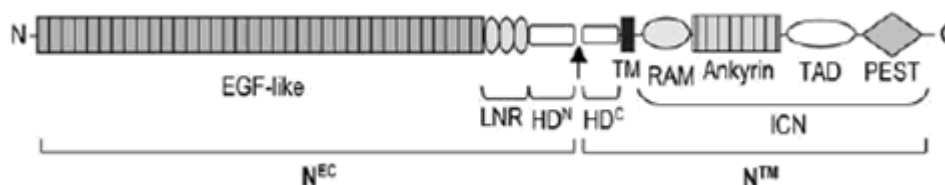


Figura 10: Esquema da proteína precursora NOTCH1, mostrando as Subunidades Extracelular (N^{EC}) e transmembrana (N^{TM}). HD = Domínio de heterodimerização, TM = domínio transmembrana, TAD = domínio de ativação da transcrição. Seta mostra o sítio de clivagem para a forma madura do receptor NOTCH1 (Weng *et al.* 2004).

Experimentos superexpressando em HSC de camundongos as mutações encontradas nos domínios HD ou PEST de NOTCH1 de LLA-T primárias mostraram que não são suficientes para desencadear a leucemia. Contudo a LLA-T é dependente dessa sinalização para sobrevivência e proliferação. Assim, mostrando que mutações em NOTCH1 seriam eventos adicionais que cooperariam com outros eventos oncogenicos influenciando o desenvolvimento do tumor. Esses tumores permanecem dependentes da sinalização de NOTCH1 (Chiang *et al.* 2008).

O processo de ativação de NOTCH1 envolve a clivagem por γ -secretase. Inibidores de γ -secretase (GSI) são capazes de bloquear a ativação de NOTCH1 (Palomero *et al.* 2008). Originalmente, os GSI foram desenvolvidos para o tratamento de doenças neurodegenerativas (Kimberly & Wolfe 2003). Em linhagens celulares de LLA-T com mutações ativadoras de NOTCH1, os GSI induzem parada do ciclo celular (G0/G1), diminuem a viabilidade celular e induzem apoptose, desse modo, sugerindo o uso de GSI no tratamento das LLA-T (Lewis *et al.* 2007).

A alta incidência de mutações ativadoras em NOTCH1 e a sua relação com a via de sinalização PI3K, tornou a inibição de NOTCH1 um atrativo para o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento da LLA-T. Como mutações ativadoras de NOTCH1

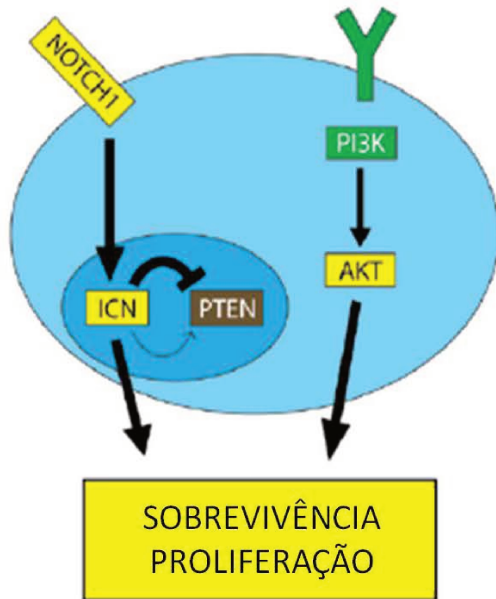
não são suficientes para desencadear a LLA-T, mas é importante na proliferação e sobrevivência (Chiang *et al.* 2008), talvez mecanismos complementares de inibição da tumorigênese devam ser usados para o tratamento da LLA-T.

NOTCH1 mutado em LLA-T pode ativar a via NF- κ B, podendo esse ser um bom alvo terapêutico. Contudo, NF- κ B sem a atuação de mutações ativadoras de NOTCH1 não foi capaz de reproduzir a leucemia em camundongos, sugerindo outras vias de atuação de NOTCH1 na leucemia (Vilimas *et al.* 2007).

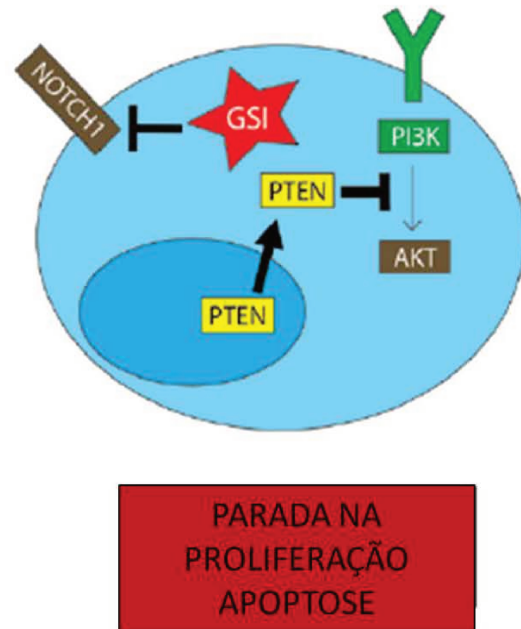
Palomero *et al.* (2007) mostraram que linhagens de LLA-T resistentes a GSI não possuíam expressão proteica de PTEN ao contrario das linhagens GSI sensíveis. Desse modo, a resistência a GSI poderia estar relacionada a atividade da proteína PTEN. A perda de PTEN acelera a progressão da doença em modelos animais de LLA-T NOTCH1 mutada, sugerindo que a ativação de NOTCH1 e a perda da atividade de PTEN colaboram com a indução da leucemia (Medyouf *et al.* 2009). A inativação de PTEN ativa a via de sinalização PI3K/AKT (Cully *et al.* 2006).

NOTCH1 e a via de sinalização PI3K/AKT atuam conjuntamente na leucemogênese (Figura 11) (Gutierrez & Look 2007). As células de LLA-T com mutações ativadoras de *NOTCH1* geram constitutivamente a forma ativa da proteína (ICN) que inibe a transcrição de *PTEN* (através de HES1). Sem o ‘freio’ de PTEN, ocorre hiperativação da via PI3K que ocasiona maior proliferação e sobrevivência da LLA-T (Figura 11A). A inibição de NOTCH1 por GSI libera a transcrição de PTEN, logo, freia-se a via PI3K/AKT, reduzindo a proliferação e aumentando a apoptose (Figura 11B). Na ausência de PTEN, a ativação de PI3K/AKT leva a proliferação e sobrevivência da LLA-T independente da ativação de NOTCH1. Estas células são insensíveis aos GSI pois a mutação ‘driver’ é em PTEN e não em NOTCH1 (Figura 11 C e D).

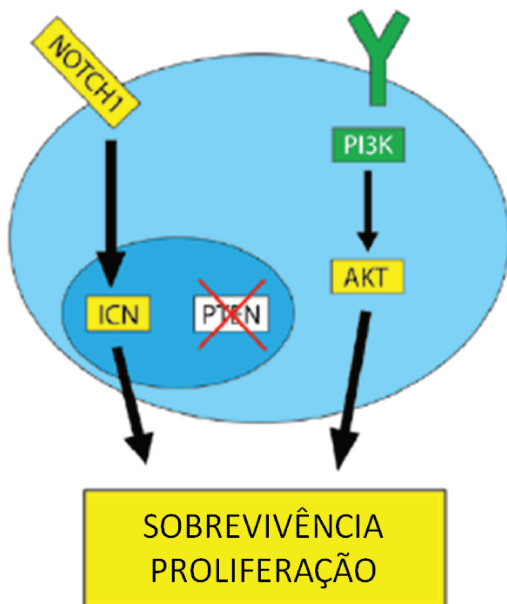
A. LLA-T PTEN positiva, sem inibição de NOTCH1



B. LLA-T PTEN positiva, inibição de NOTCH1 por GSI



C. LLA-T PTEN negativa, sem inibição de NOTCH1



D. LLA-T PTEN negativa, inibição de NOTCH1 por GSI

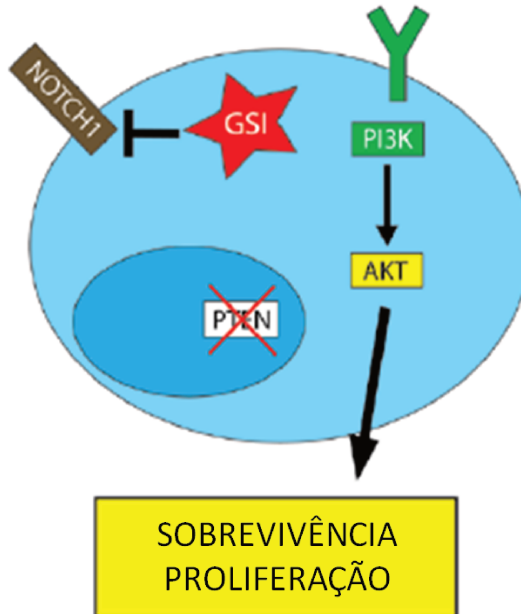


Figura 11: Interrelação entre NOTCH1 e PI3K/AKT na leucemogenese da LLA-T (Adaptado de Gutierrez & Look 2007). Descrição encontra-se no corpo da tese.

Na época em que o trabalho deste segundo capítulo foi feito, o conhecimento que se tinha de regulação transcricional de *PTEN* por NOTCH1 era de linhagens celulares de LLA-T. Os dados precisavam ser confirmados em amostras de pacientes. Em todo caso, nossos resultados anteriores indicavam que a principal inibição de PTEN nas LLA-T não se dá a nível transcricional (via NOTCH), mas pela inibição pós-traducional por CK2 (Silva *et al.* 2008). Como mutações em *NOTCH1* e mutações/inativação de PTEN são dois dos principais fatores que concorrem para a LLA-T (Gutierrez & Look, 2007) resolvemos testar se haveria vantagem no uso combinado de inibidor de GSI com inibidor de CK2. Esses resultados são apresentados na forma de artigo publicado.

4.2- Resultados - Manuscrito:

Regulation of PTEN by CK2 and Notch1 in primary T-cell acute lymphoblastic leukemia: rationale for combined use of CK2- and γ -secretase inhibitors

Ana Silva, Patrícia Y. Jotta, André B. Silveira, Daniel Ribeiro, Silvia R. Brandalise, J. Andrés Yunes e João T. Barata.

Artigo em que divido a primeira autoria com Ana Silva

Regulation of PTEN by CK2 and Notch1 in primary T-cell acute lymphoblastic leukemia: rationale for combined use of CK2- and γ -secretase inhibitors

Ana Silva,¹ Patrícia Y. Jotta,² André B. Silveira,² Daniel Ribeiro,¹ Silvia R. Brandalise,^{2,3} J. Andrés Yunes,² and João T. Barata¹

¹Cancer Biology Unit, Instituto de Medicina Molecular, Lisbon University Medical School, Lisboa, Portugal; ²Centro Infantil Boldrini, Campinas, SP, Brazil, and ³Departamento de Pediatria, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil

ABSTRACT

T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) patients frequently display *NOTCH1* activating mutations and Notch can transcriptionally down-regulate the tumor suppressor *PTEN*. However, it is not clear whether *NOTCH1* mutations associate with decreased *PTEN* expression in primary T-ALL. Here, we compared patients with or without *NOTCH1* mutations and report that the former presented higher *MYC* transcript levels and decreased *PTEN* mRNA expression. We recently showed that T-ALL cells frequently display CK2-mediated *PTEN* phosphorylation, resulting in *PTEN* protein stabilization and concomitant functional inactivation. Accordingly, the T-ALL samples analyzed, irrespectively of their *NOTCH1* mutational status, expressed significantly higher *PTEN* protein levels than normal controls. To evaluate the integrated functional impact of Notch transcriptional and CK2 post-translational inactivation of *PTEN*, we treated T-

ALL cells with both the gamma-secretase inhibitor DAPT and the CK2 inhibitors DRB/TBB. Our data suggest that combined use of gamma-secretase and CK2 inhibitors may have therapeutic potential in T-ALL.

Key words: *NOTCH1*, protein stabilization, CK2 inhibitors, T-ALL.

Citation: Silva A, Jotta PY, Silveira AB, Ribeiro D, Brandalise SR, Yunes JA, and Barata JT. Regulation of *PTEN* by CK2 and *Notch1* in primary T-cell acute lymphoblastic leukemia: rationale for combined use of CK2- and γ -secretase inhibitors. *Haematologica*. 2010;95:674-678. doi:10.3324/haematol.2009.011999

©2010 Ferrata Storti Foundation. This is an open-access paper.

Introduction

T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) patients frequently display *NOTCH1* activating mutations.¹ Recently it was demonstrated that Notch1 can negatively regulate *PTEN* at the transcriptional level.² It was further suggested that such negative regulation could occur in diagnostic T-ALL cells collected from patients. However, the actual impact of *NOTCH1* mutations on *PTEN* expression and activity in primary T-ALL is still unclear. Although *NOTCH1* mutations are expected to occur in approximately 50% of diagnostic T-ALL cases,^{2,3} most samples appear to display high *PTEN* protein levels compared to normal thymocytes.⁴ The apparently paradoxical increase in *PTEN* expression results from CK2-mediated phosphorylation of *PTEN* and consequent *PTEN* protein stabilization and functional inactivation, which ultimately contributes to hyperactivation of PI3K/Akt oncogenic pathway in T-ALL cells.⁴ Here, we sought to understand how Notch1- and CK2-mediated regulation of *PTEN* may be integrated and explored therapeutically in T-ALL.

Design and Methods

Primary samples and T-ALL cell lines

T-ALL cells were obtained at diagnosis from bone marrow or peripheral blood of pediatric patients with high leukemia involvement (85-100%). Samples were enriched by density centrifugation over Ficoll-Paque (GE Healthcare). Normal thymocytes were isolated from thymic tissue obtained from children undergoing cardiac surgery as described.⁴ Informed consent and institutional review board approval (Gabinete de Investigação Clínica, Instituto Português de Oncologia, and Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas) were obtained in accordance with the Declaration of Helsinki. TALL7, which shares significant similarities with primary leukemia samples,⁵ TALL-1 and HPB-ALL are *PTEN*-positive T-ALL cell lines.

NOTCH1 sequencing and mutational analysis

Part of exon 26, the whole exon 27 and the beginning (nt 4677-5255) of exon 28 was amplified from cDNA samples using primers Notch2627F and Notch2627R, and sequenced using the same primers.

AS and PYJ contributed equally to this work.

Acknowledgments: The authors would like to thank the contribution of patients and the clinical teams involved in providing primary leukemia samples, Dr. Miguel Abecasis for providing thymic specimens, and Dr. Adolfo Ferrando for providing some of the *NOTCH* sequencing primers. Funding: this work was supported by grants from Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT; POCL/SAU-OBS/58913 and PTDC/SAU-OB/69974), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; 08/10034-1), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; 401122/2005-0). AS and PYJ have FCT SFRH and FAPESP PhD scholarships, respectively. Manuscript received on May 27, 2009. Revised version arrived on September 18, 2009. Manuscript accepted on October 8, 2009. Correspondence: João T. Barata, Cancer Biology Unit, Instituto de Medicina Molecular, Lisbon University Medical School, Av. Prof. Egas Moniz, 1649-028 Lisboa, Portugal. E-mail: joao_barata@fm.ul.pt
The Online version of this article has a Supplementary Appendix.

In some cases, exon 26 and exon 27 were amplified and sequenced from genomic DNA with the intronic primers Notch26F and Notch26R, and Notch27F and Ex27R743, respectively. The region spanning TAD and PEST domains of exon 34 was amplified with primers Notch34TF and Notch34PR, and the resulting 855 bp fragment was sequenced with primers Notch34TF and Ex34PestF. The PEST coding region was also amplified with primers Ex34PestF and Ex34PestR, followed by semi-nested PCR with primers Notch34PF and Ex34PestR, and sequenced with primer Ex34PestR. This strategy covered all mutational hot-spot regions previously reported for *NOTCH1*.^{1,67} Primer sequences and the PCR protocol are shown in the Online Supplementary Appendix. All mutations were confirmed by sequencing a newly amplified product. When necessary, PCR amplicons were cloned into pGEM-T vector (Promega) and several individual clones were sequenced.

Quantitative RT-PCR

Total RNA (1 µg) was reverse transcribed using the ImProm II Reverse Transcriptase enzyme (Promega) and random hexamers. The quantitative assessment of *HES1*, *MYC* and *PTEN* transcripts was made by Q-PCR on a StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems). PCR products were cloned into the pGEM-T Easy vector (Promega) and standard curves were obtained by serial dilutions of uncut plasmid. *HES1*, *MYC* and *PTEN* transcript values were normalized with respect to the number of ABL transcripts. PCR reactions were performed in 15 µL containing 5 µL of diluted cDNA (~5X dilution), 7.5 pmol of each primer, and 7.5 µL of SYBR Green Master Mix (Roche). Primers and PCR protocols are shown in the Online Supplementary Appendix. Q-PCR

expression values were transformed into log values. Experiments were carried out in duplicates.

Western blot

Cells were lysed in 50mM Tris-HCl pH 8.0, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 1% (v/v) NP-40, 1mM Na₂VO₄, 10mM NaF, 10mM NaPyroph, 1mM 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl (AEBSEF), 10µg/ml leupeptin, 10 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml Pepstatin, resolved by 10% SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membranes, and immunoblotted with the following antibodies: PTEN, P-PTEN (S380) and Notch Val1744 (Cell Signaling Technology), ZAP-70 (Upstate), and Actin (Santa Cruz Biotechnology). Densitometry analysis of PTEN and Actin was performed using Image Quant 5.2 software. Each band was analyzed with a constant frame.

Analysis of cell size, cell number, proliferation and cell viability

Cells were cultured in 24-well plates as 2×10^5 cells/mL at 37°C with 5% CO₂ in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FBS in the presence or absence of DRB/TBB and/or DAPT, and analyzed after three, four or seven days. Cell size was analyzed by flow cytometry, as described.⁸ Total cell counts were calculated by trypan blue exclusion using a hemocytometer. Proliferation was assessed as described.⁹ Briefly, cells were cultured in flat-bottom 96-well plates and incubated with ³H-thymidine (27×10³ mBq/well) for 16 hours prior to harvest. ³H-thymidine incorporation was assessed using a liquid scintillation counter. Viability was evaluated by flow cytometry analysis of FSC x SSC pattern, as described.⁸ Minimum tested dose of each inhibitor (1, 5 or 10 µM

Table 1. Alterations in *NOTCH1* gene, predicted Notch1 protein changes and PTEN mRNA levels in primary T-ALL.

N.	Exon	Nucleotide change ^a	Predicted change	PTEN mutation (exon)	PTEN mRNA levels ^d
1	26	c.[4727T>A]+[=]	p.[V1576E]+[=]		1.011
	34	c.[7419_7420 insTGGTC]+[=]	p.[P2474WfsX5]+[=]		
2		Not detected			1.569
3	26	c.[4817insGGA]+[=]	p.[F1606delinsLD]+[=]		2.423
4		Not detected		7	1.396
5	26	c.[4754_4755insCCCCGGAAGCAG]+[=]	p.[L1585delinsPPEAV]+[=]		1.236
6	34	c.[7327delGinsCCCCCTTCC]+[=]	p.[V2443PfsX66]+[=]		1.012
7		Not detected			1.378
8	34	c.[7327_7328delGTinsACCCTTTGACTCCC]+[=]	p.[V2443TfsX3]+[=]		1.164
9		Not detected			2.320
10	26	c.[4744_4754delCCCGAGCAGCTinsATAGAGGC]+[=]	p.[P1582_L1585delinsIEA]+[=]		0.938
11		Not detected		1, 7	1.540
12		Not detected			n.d.
13	26	c.[4832_4852delACGGCCAGCAGATGATCTTCinsGGGGGA]+[=]	p.[H1611_P1618delinsRGT]+[=]		1.058
14		Not detected			1.868
15		Not detected			1.082
16		Not detected			1.073
17		Not detected		7	n.d.
18	26	c.[4799T>A]+[=]	p.[L1600Q]+[=]		0.992
19	34	c.[6991G>A]+[=] ^b	p.[A2331T]+[=]	Trans ^c	0.591

^aNumbers from Notch1 Accession Number NM_017617; ^bMutation in the TAD domain; ^cTranslocation involving chromosome 10q; ^dQuantified by quantitative RT-PCR; normalized to ABL; n.d., not determined.

DAPT; 12.5 or 25 μ M DRB/TBB) that originated at least a 10% inhibitory effect was identified for each cell line, for each functional assay, and used in combination for the assessment of cooperative effects. For primary T-ALL cells, the TBB dose had been previously determined⁴ and DAPT was tested at a single, high concentration (5 μ M).

Statistical analysis

Differences between populations were calculated using an unpaired two-tailed Mann-Whitney test, Student's *t* test, or One-Way ANOVA, as appropriate. Differences were considered significant for $P < 0.05$.

Results and Discussion

We classified 19 diagnostic T-ALL specimens as *NOTCH1* wild-type (NOTCH-WT) or mutated (NOTCH-mut) after sequencing of *NOTCH1* mutational hot spots (exons 26, 27, and 34) and also part of exon 28 (nt 5209-5221), recently shown to be altered in T-ALL.⁷ Our data

show that 50% of the patients displayed *NOTCH1* mutations (Table 1).

As determined by Q-PCR, NOTCH-mut patient samples displayed higher mRNA levels of the Notch target gene *MYC* than NOTCH-WT specimens ($P = 0.004$, two-tailed Mann-Whitney test; Figure 1A). These observations are in accordance with previous studies demonstrating the importance of *MYC* as a downstream effector of Notch-mediated leukemogenesis,^{10,12} and with recent evidence that *MYC* mRNA levels are up-regulated in primary T-ALL cells with *NOTCH1* activating mutations.¹³ Although NOTCH-mut T-ALL also presented a tendency for higher *HES1* levels (median *HES1/ABL* = -0.954 vs. -1.449) the difference was not statistically significant ($P = 0.4363$; Figure 1B). Importantly, *PTEN* mRNA levels were significantly decreased in NOTCH-mut primary T-ALL cells ($P = 0.021$; Figure 1C and Table 1). In addition, NOTCH-mut T-ALLs displayed a tendency to have lower PTEN protein levels than NOTCH-WT samples (median = 0.769 vs. 0.481, $P = 0.158$; Figure 1D and E). Moreover, the gamma-secretase inhibitor (GSI) DAPT up-regulated PTEN protein

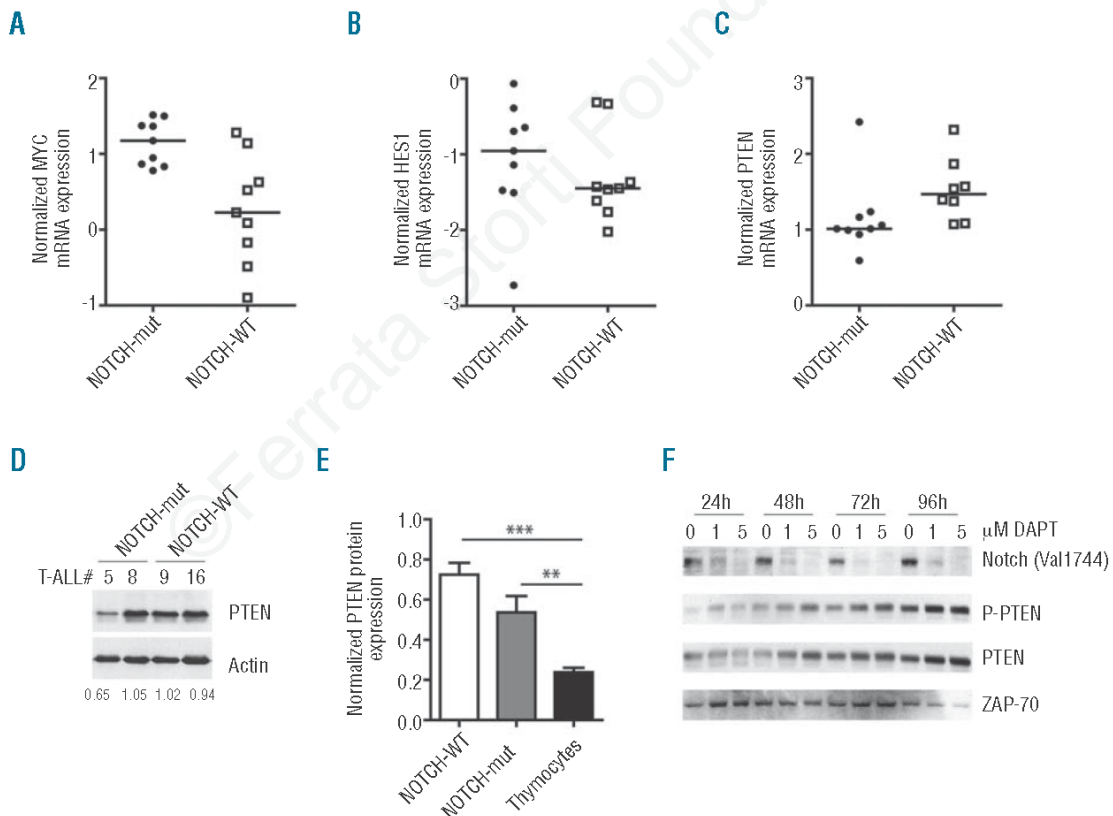


Figure 1. NOTCH1 mutations associate with decreased PTEN expression in primary T-ALL. Diagnostic T-ALL specimens classified as *NOTCH1* mutated (NOTCH-Mut; n=9) or wild-type (NOTCH-WT; n=9, except for *PTEN* analysis n=8) were compared by Q-PCR for mRNA expression of (A) *HES1* ($P = 0.436$), (B) *MYC* ($P = 0.004$), and (C) *PTEN* ($P = 0.021$). Transcript copy numbers were normalized with respect to the number of *ABL* transcripts and transformed into logarithmic values. (D) NOTCH-WT and NOTCH-Mut samples were analyzed by Western blot for PTEN protein expression. Actin was used as a loading control. Densitometry analysis values of PTEN normalized to Actin are shown for each case. (E) PTEN protein levels in NOTCH-WT T-ALL (n=3), NOTCH-mut T-ALL (n=5) and normal thymocytes (n = 6) were evaluated by densitometry analysis after Western Blot and normalized to the Actin loading control. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.0001$. (F) Primary-like leukemia TAIL7 cells were cultured with or without 1 or 5 μ M DAPT. At the indicated time points, cells were lysed and evaluated by Western blot for the expression of cleaved (activated) Notch (Val1744), PTEN, and P-PTEN(S380). ZAP-70 was used as a loading control. Data are representative of two independent experiments.

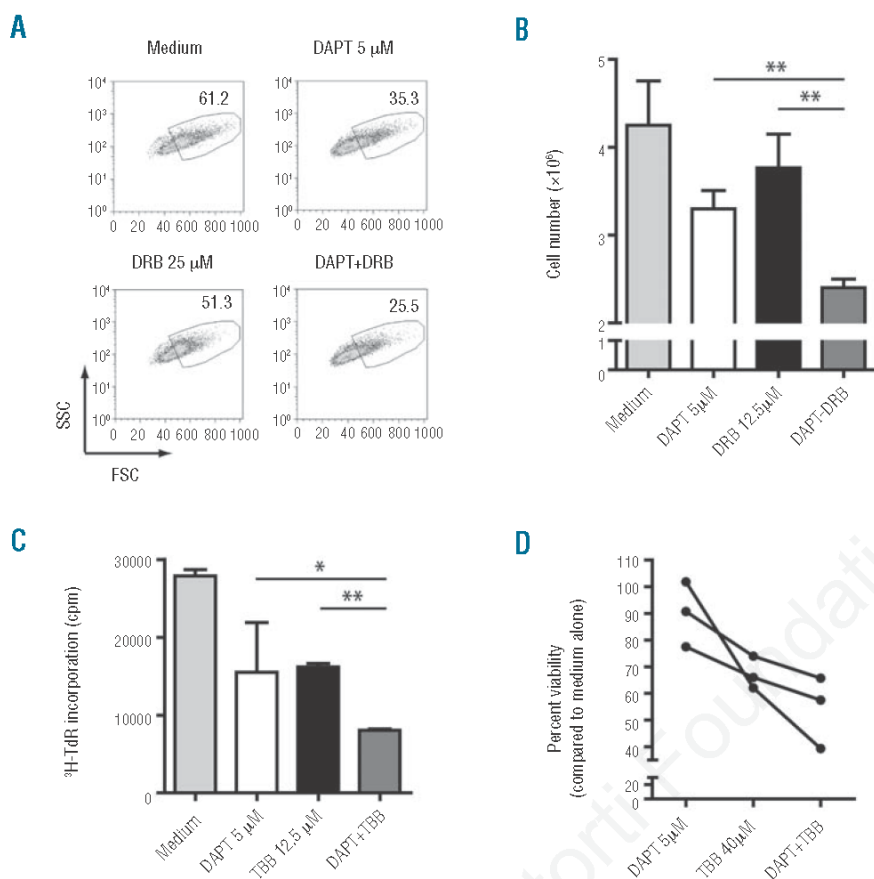


Figure 2. GSI and CK2 inhibitors collaborate in decreasing T-ALL cell proliferation. PTEN-positive T-ALL cell lines HPB-ALL (A and C) and TAIL7 (B), and primary T-ALL cells (D), were used to test the cooperative impact of combined treatment with the GSI DAPT and the CK2 inhibitors DRB or TBB, at the indicated concentrations (see Design and Methods section). (A) Cells were cultured for 72h and evaluated for alterations in cell size by forward scatter flow cytometry analysis. (B and C) After seven days of culture, total cell counts (B) were calculated by trypan blue exclusion using a hemocytometer, and proliferation (C) was evaluated by assessing DNA synthesis by 3 H-thymidine incorporation. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. (D) Primary T-ALL cells from 3 different patients were assessed for cell viability by flow cytometry at 72h of culture. $P = 0.020$; One-way ANOVA.

expression in the primary-like leukemia cell line TAIL7 (Figure 1F), indicating that Notch inhibition results in increased PTEN protein expression. Altogether, our data suggest that activating mutations of *NOTCH1* transcriptionally down-regulated *PTEN* in primary leukemia, in agreement with what was demonstrated in immortalized T-ALL cell lines.²

We recently demonstrated that most primary T-ALL samples have higher PTEN protein levels than normal human thymocytes.⁴ This stems from the fact that leukemia cells over-express CK2, which mediates phosphorylation and consequent protein stabilization, but functional inactivation, of PTEN.⁴ In this context, it is tempting to hypothesize that T-ALL samples with decreased *PTEN* mRNA expression due to *NOTCH1* mutations may have stabilized, although inactivated, PTEN protein, as a consequence of CK2-mediated phosphorylation. In line with this possibility, we found that not only NOTCH-WT but also NOTCH-mut samples had significantly higher PTEN protein levels than normal human thymocytes (Figure 1E). Furthermore, GSI-dependent upregulation of PTEN protein in TAIL7 cells was paralleled by PTEN phosphorylation in the CK2 target residue Ser380 (Figure 1F). Our data suggest that the impact of Notch1-mediated *PTEN* transcriptional down-regulation may be partially compensated at the protein

level by CK2-dependent PTEN phosphorylation and stabilization. This could explain why: 1) NOTCH-mut patients display somewhat lower but similar PTEN protein levels to other T-ALL cases, and 2) both NOTCH-WT and NOTCH-mut samples express higher PTEN protein levels than normal thymocytes.

Despite the opposite effects on PTEN protein levels, Notch1 and CK2 ultimately contribute to PTEN inactivation by complementary mechanisms. Therefore, we speculated that the combination of GSI and CK2 inhibitors could have a cooperative effect in restoring PTEN function and thereby targeting leukemia cells. This is particularly relevant given the relative inefficacy of GSI treatment in T-ALL patients¹⁴ and recent clinical data in patients with cervical cancer indicating that CK2 antagonists are well tolerated and may have antitumor efficacy.¹⁵ Hence, we treated PTEN-positive T-ALL cell lines with GSI DAPT and/or the CK2-specific inhibitors DRB or TBB. Analyses of cell size (Figure 2A and Online Supplementary Figure S4), total cell counts (Figure 2B and Online Supplementary Figure S2) and proliferation (Figure 2C and Online Supplementary Figure S3) revealed that combination of GSI and CK2 inhibitors have a mild but consistent cooperative effect in diminishing leukemia proliferation. Similar results were obtained regarding cell viability using diagnostic primary leukemia cells (Figure 2D).

Overall, our studies support the notion that *NOTCH1* mutations can lead to decreased *PTEN* mRNA expression in primary T-ALL.² However, this negative effect on *PTEN* expression appears counterbalanced, at least in part, by CK2-mediated phosphorylation and stabilization of PTEN protein, which are associated with PTEN functional inactivation and consequent hyperactivation of PI3K/Akt pathway.⁴ Evidently, these observations do not exclude the possibility that other Notch-dependent mechanisms, in addition to *PTEN* transcriptional downregulation, may promote PI3K/Akt pathway activation in T-ALL cells. For example, it was recently shown that NOTCH1 up-regulates IL-7R α expression in T-ALL cells.¹⁶ This is particularly interesting given that the PI3K/Akt pathway is essential for IL-7/IL-7R-mediated survival, growth and proliferation of primary T-ALL cells *in vitro*.⁸

There is evidence from both mouse models and human cancers that *PTEN* is haploinsufficient for tumor suppression and that the exact level of PTEN activity in a cell is a

key determinant of cancer progression.¹⁷ In primary T-ALL cells, PTEN activity appears to be negatively regulated at the transcriptional level by Notch, and posttranslationally by CK2. Our data indicate that targeting simultaneously these two molecular mechanisms can lead to more effective inhibition of leukemia cell viability and proliferation *in vitro*. These observations may have important therapeutic implications for the treatment of diagnostic T-ALL.

Authorship and Disclosures

AS, PYJ, ABS and DR performed research and analyzed data. SRB coordinated the recruitment and treatment of patients. JAY designed research, analyzed data, supervised the work, and contributed to the writing of the manuscript. JTB designed research, analyzed data, supervised the work and wrote the paper.

The authors reported no potential conflicts of interest.

References

- Weng AP, Ferrando AA, Lee W, Morris JP, Silverman LB, Sanchez-Irizarry C, et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science*. 2004;306(5694):269-71.
- Palomero T, Sulis ML, Cortina M, Real PJ, Barnes K, Ciofani M, et al. Mutational loss of PTEN induces resistance to NOTCH1 inhibition in T-cell leukemia. *Nat Med*. 2007;13(10):1203-10.
- Maser RS, Choudhury B, Campbell PJ, Feng B, Wong KK, Protopopov A, et al. Chromosomally unstable mouse tumours have genomic alterations similar to diverse human cancers. *Nature*. 2007;447(7147):966-71.
- Silva A, Yunes JA, Cardoso BA, Martins LR, Jotta PY, Abecasis M, et al. PTEN posttranslational inactivation and hyperactivation of the PI3K/Akt pathway sustain primary T cell leukemia viability. *J Clin Invest*. 2008;118(11):3762-74.
- Barata JT, Boussiotis VA, Yunes JA, Ferrando AA, Moreau LA, Veiga JP, et al. IL-7-dependent human leukemia T-cell line as a valuable tool for drug discovery in T-ALL. *Blood*. 2004;103(5):1891-900.
- Breit S, Stanulla M, Flohr T, Schrappe M, Ludwig WD, Tolle G, et al. Activating NOTCH1 mutations predict favorable early treatment response and long-term outcome in childhood precursor T-cell lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2006;108(4):1151-7.
- Sulis ML, Williams O, Palomero T, Tosello V, Pallikuppam S, Real PJ, et al. NOTCH1 extracellular juxtamembrane expansion mutations in T-ALL. *Blood*. 2008;112(3):733-40.
- Barata JT, Silva A, Brandao JG, Nadler LM, Cardoso AA, Boussiotis VA. Activation of PI3K Is Indispensable for Interleukin 7-mediated Viability, Proliferation, Glucose Use, and Growth of T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Cells. *J Exp Med*. 2004;200(5):659-69.
- Barata JT, Cardoso AA, Nadler LM, Boussiotis VA. Interleukin-7 promotes survival and cell cycle progression of T-cell acute lymphoblastic leukemia cells by down-regulating the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(kip1). *Blood*. 2001;98(5):1524-31.
- Sharma VM, Calvo JA, Draheim KM, Cunningham LA, Hermance N, Beverly L, et al. Notch1 contributes to mouse T-cell leukemia by directly inducing the expression of c-myc. *Mol Cell Biol*. 2006;26(21):8022-31.
- Weng AP, Millholland JM, Yashiro-Ohtani Y, Arcangeli ML, Lau A, Wai C, et al. c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Genes Dev*. 2006;20(15):2096-109.
- Palomero T, Lim WK, Odom DT, Sulis ML, Real PJ, Margolin A, et al. NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(48):18261-6.
- Larson Gedman A, Chen Q, Kugel Desmoulin S, Ge Y, Lafiura K, Haska CL, et al. The impact of NOTCH1, FBW7 and PTEN mutations on prognosis and downstream signaling in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *Leukemia*. 2009;23(8):1417-25.
- Real PJ, Tosello V, Palomero T, Castillo M, Hernandez E, de Stanchina E, et al. Gamma-secretase inhibitors reverse glucocorticoid resistance in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med*. 2009;15(1):50-8.
- Solares AM, Santana A, Baladron I, Valenzuela C, Gonzalez CA, Diaz A, et al. Safety and preliminary efficacy data of a novel casein kinase 2 (CK2) peptide inhibitor administered intravesically at four dose levels in patients with cervical malignancies. *BMC Cancer*. 2009;9:146.
- Gonzalez-Garcia S, Garcia-Peydro M, Martin-Gayo E, Ballestar E, Esteller M, Bornstein R, et al. CSL-MAML-dependent Notch1 signaling controls T lineage-specific IL-7R(alpha) gene expression in early human thymopoiesis and leukemia. *J Exp Med*. 2009;206(4):779-91.
- Salmena L, Carracedo A, Pandolfi PP. Tenets of PTEN tumor suppression. *Cell*. 2008;133(3):403-14.

Regulation of PTEN by CK2 and Notch1 in primary T-cell acute lymphoblastic leukemia: rationale for combined use of CK2- and γ -secretase inhibitors

Ana Silva,¹ Patrícia Y. Jotta,² André B. Silveira,² Daniel Ribeiro,¹ Sílvia R. Brandalise,^{2,3} J. Andrés Yunes,² and João T. Barata¹

¹Cancer Biology Unit, Instituto de Medicina Molecular, Lisbon University Medical School, Lisboa, Portugal; ²Centro Infantil Boldrini, Campinas, SP, Brazil, and ³Departamento de Pediatria, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil

Citation: Silva A, Jotta PY, Silveira AB, Ribeiro D, Brandalise SR, Yunes JA, and Barata JT. Regulation of PTEN by CK2 and Notch1 in primary T-cell acute lymphoblastic leukemia: rationale for combined use of CK2- and γ -secretase inhibitors. *Haematologica*. 2010;95:674-678. doi:10.3324/haematol.2009.011999

Supplementary information

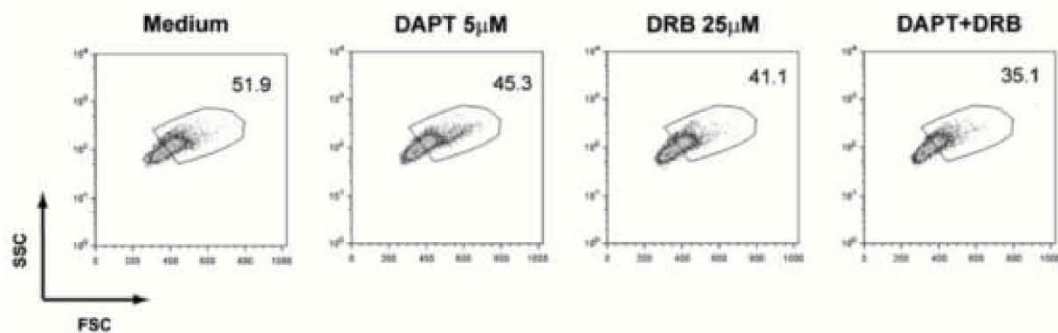
The cycling protocol for *NOTCH1* amplifications consisted of 1 cycle at 94°C for 3 min, followed by 10 cycles of annealing at decreasing temperatures from 61°C to 57°C (1°C decrease every two cycles) for 30 s, extension at 72°C for 1:45 min and denaturation at 95°C for 30 s. Subsequently, 30 cycles were performed with annealing at 56°C for 30 s. A final extension step for 5 min at 72°C was included. PCR reactions contained 50ng of DNA or 0.5 μ l cDNA, 10 pmol of each primer, 2 mM MgCl₂, 5% DMSO, 1X PCR Buffer (Biotools), and 1.5 U of Taq DNA Polymerase (Biotools). The PCR cycling protocol for *PTEN*, *HES1*, and *ABL* consisted of 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of 58°C for 30 s, 72°C for 40 s, 95°C for 15 s, and a final extension step for 5 min at 72°C. For *MYC* a two-step cycling protocol was used consisting of 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of annealing/extension at 65°C for 1 min and 95°C for 15 s, and a final extension step for 5 min at 72°C. A standard melting-curve cycle was used to check the quality of amplification, such as no primer dimer being formed during PCR. Fluorescence was measured at 72°C.

Online Supplementary Table S1. Primers used for *NOTCH1* sequencing and RQ-PCR analysis of *HES1*, *MYC*, *PTEN*, and *ABL*.

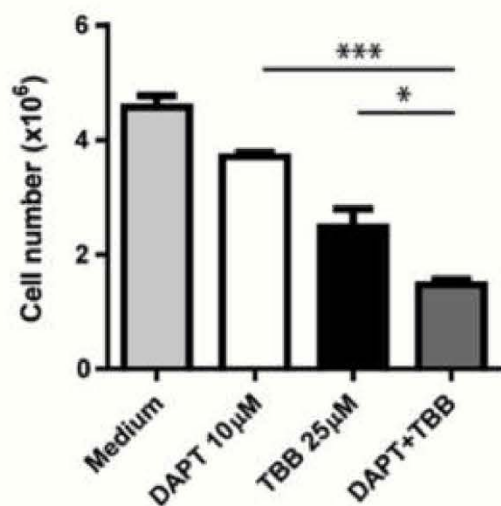
Primer	Primer sequence (5'→3')	Reference
Primers for PCR and sequencing of <i>NOTCH1</i>		
Notch2627F	GGACTGTGCGGAGCATGTA	1
Notch2627R	CAGCCACGAAGAAGACAGAA	1
Notch26F	CAGTGGGCTGGAGGCA	1
Notch26R	GGGGATTGACCGTGGG	1
Notch27F	GGTGGGTATCTGGGATGAGC	1
Ex27R743	GAAAAGCCCTACCCCAACTC	2
Notch34TF	TTTGAATGGTCAATGCGAGTG	1
Notch34PR	AAAAGGCTCCTCTGGTCCG	1
Ex34PestF	CCTCACCTGGTGACAGCC	2
Ex34PestR	AAATTAAATCCTCGTTCTTATTTTG	2
Notch34PF	AGCCAGCAACATCCAGC	1
Primers for RQ-PCR		
HES1-F	TGGAAATGACAGTGAAGCACCT	3
HES1-R	GTTTCATGCACTCGCTGAAGC	3
MYC-F	CTTCTCTCCGTCCTCGGATTCT	4
MYC-R	GAAGGTGATCCAGACTCTGACCTT	4
PTEN-F	GCTACCTGTTAAAGAATCATCTGG	1
PTEN-R	CATGAACCTTGTCTTCCCGT	5
ABL-F	TGGAGATAACACTCTAAGCATAACTAAAGGT	6
ABL-R	GATGTAGTTGCTTGGGACCCA	6

References

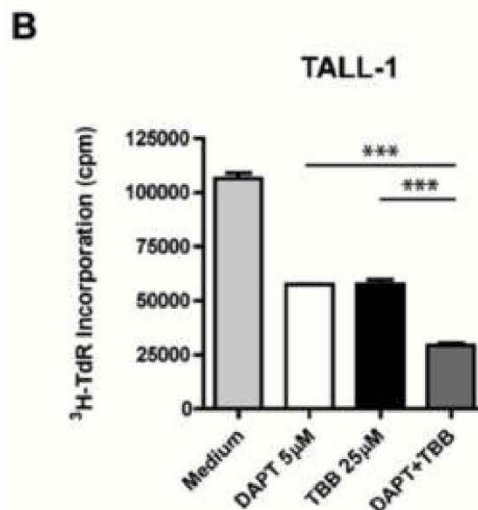
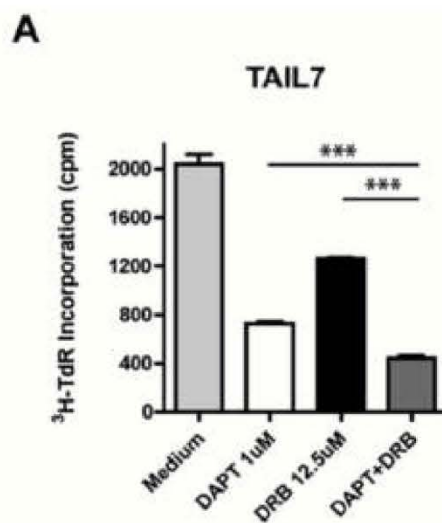
1. This work. PTEN forward primers were designed to provide the most possible difference to the PTEN pseudogene transcript.
2. Kindly provided by Dr Adolfo Ferrando, Columbia University, NY.
3. Jaleco AC, Neves H, Hooijberg E, Gameiro P, Clode N, Haury M, et al. Differential Effects of Notch Ligands Delta-1 and Jagged-1 in Human Lymphoid Differentiation. *J Exp Med* 2001; 194(7): 991-1001.
4. Weng AP, Millholland JM, Yashiro-Ohtani Y, Arcangeli ML, Lau A, Wai C, et al. c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Genes Dev*. 2006; 20(15):2096-109.
5. Zhou YH, Tan F, Hess KR, Yung WK. The expression of PAX6, PTEN, vascular endothelial growth factor, and epidermal growth factor receptor in gliomas: relationship to tumor grade and survival. *Clin Cancer Res*. 2003; 9(9):3369-75.
6. Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VHJ, Bi W, Dee R, van der Schoot E, et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR)—A Europe against cancer program. *Leukemia*. 2003;17:474-86.



Online Supplementary Figure S1. Cooperative effects of GS- and CK2 inhibitors in decreasing the size of TAIL7 cells. TAIL7 cells were cultured in the indicated conditions for 72h and cell size was determined by FSC x SSC discrimination by flow cytometry analysis.



Online Supplementary Figure S2. Cooperative effects of GS- and CK2 inhibitors in decreasing HPB-ALL cell numbers. HPB-ALL cells were cultured in triplicates for four days in the indicated conditions and number of viable cells was assessed by trypan blue exclusion using a hemocytometer. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$.



Online Supplementary Figure S3. Cooperative effects of GS- and CK2 inhibitors in decreasing TAIL7 and TALL-1 cell proliferation. TAIL7 (A) and TALL-1 (B) cells were cultured in triplicates for seven days in the indicated conditions and proliferation was evaluated by assessing DNA synthesis by ^3H -thymidine incorporation. *** $P < 0.001$.

4.3- Discussão

Dados da literatura, realizados com linhagens celulares, informavam que mutações ativadoras de *NOTCH1* levam a aumento de expressão de *HES1* e *MYC*, os quais têm diferente papel na regulação da transcrição de *PTEN* (Palomero *et al.* 2008, Palomero *et al.* 2006). Como nem sempre os resultados de linhagens celulares refletem aquilo que ocorre em células de pacientes, fizemos estudo para averiguar a expressão desses genes em aproximadamente 20 casos de LLA-T de pacientes, caracterizados quanto a mutações de *NOTCH1*.

A expressão forçada de c-MYC é capaz de restaurar o crescimento das células leucêmicas de LLA-T cultivadas com inibidores de NOTCH1, mostrando que a ativação de NOTCH1 leva ao crescimento celular através da ativação de c-MYC (Palomero *et al.* 2007). Nós encontramos uma maior expressão de *MYC* em pacientes *NOTCH1* mutados corroborando esses achados.

Verificamos que pacientes mutados para *NOTCH1* apresentam aumento na expressão de *HES1* e diminuição de *PTEN* (mRNA) em relação a pacientes NOTCH1 selvagem. Desse modo, é provável que NOTCH1 diminua a transcrição do gene *PTEN* via o repressor HES-1 como descrito em linhagens de LLA-T (Palomero *et al.* 2007). Usando inibidores de NOTCH1 (γ -secretases), verificamos aumento da expressão proteica de PTEN em linhagem celular de LLA-T. Contudo, pouco adianta ter mais proteína PTEN quando a mesma está inativada por fosforilação (Silva *et al.* 2008; Song *et al.* 2012). Em suma, contribuem para a hiperativação da via PI3K/AKT nas LLA-T primárias tanto a repressão transcricional de *PTEN* via NOTCH1 quanto a pós-traducional via CK2.

Ao inibirmos NOTCH1 em linhagem celular TAIL7 por GSI observamos que a quantidade da proteína PTEN aumentou, contudo estava inativada (fosforilação do resíduo Ser380 por CK2). A LLA-T superexpressa CK2 (Silva A, *et al.* 2008). Dessa maneira, PTEN estaria inativa e estável, justificando a maior quantidade de proteína PTEN nas LLA-T em comparação a timócitos normais.

Testes clínicos de fase I mostraram toxicidade intestinal e nenhuma resposta significativa ao uso de GSI (MK-0752) em pacientes com LLA-T refratária. Contudo ao combinar com o uso de glicocorticóides, camundongos xenógrafos de LLA-T apresentaram redução significativa do tumor e da toxicidade. Esse efeito pode ser devido ao fato de NOTCH1 regular negativamente a expressão dos receptores de glicocorticóides (Samon *et al.* 2012). Assim, a atividade antitumoral seria devido ao aumento da eficiência de atuação dos glicocorticoides.

mTOR (mammalian target of rapamycin) é um efetor direto da via de sinalização PI3K/AKT, mas sua atividade também é controlada por outras vias de sinalização que incluem a via de RAS (Martelli *et al.* 2012). A ativação constitutiva de mTORC é comum em LLA-T, constituindo um potencial alvo terapêutico. O uso de inibidores de mTOR de primeira geração (rapamycin/rapalog family) em modelos preclínicos de LLA-T mostrou resultados fracos. Uma possível estratégia para melhorar a eficiência seria a inibição conjunta das vias de sinalização da PI3K e mTOR (Evangelisti *et al.* 2011). Espera-se que a inibição conjunta de várias vias de sinalização de sobrevivência celular nas LLA-T tenha melhores efeitos. Gutierrez & Look (2007) sugerem o uso combinado como alvos terapêuticos de NOTCH1 e da via PI3K/AKT. Em nosso estudo anterior mostramos que PTEN está inativado nas LLA-T por CK2 (Silva *et al.* 2008), assim devem ser resistentes a GSI como mostrado em estudos com linhagens celulares (Palomero *et al.* 2007). Tanto NOTCH1 quanto CK2 inativam a proteína PTEN de maneira complementar. Nesse trabalho, especulamos que a combinação de inibidores de NOTCH1 (GSI) e CK2 (DRB e TBB) poderia restaurar a atividade supressora tumoral de PTEN e inibir a proliferação e sobrevivência da LLA-T. Contudo não solucionaria em 18% dos casos de LLA-T que possuem mutações em *PTEN*.

A combinação desses inibidores reduziu significativamente a proliferação e a viabilidade das células leucêmicas, mostrando um efeito maior que quando usados isoladamente. Mutações ativadoras de NOTCH1 ocorrem em 50% (Weng *et al.* 2004) e a hiperativação da via PI3K/AKT pela inativação de PTEN em 87,5% das LLA-T (Silva *et al.* 2008). Desse modo, a inibição conjunta de NOTCH1 e CK2 parece ser um

promissor alvo terapêutico para o tratamento da LLA-T. Experimentos *in vivo* são necessários para maiores conclusões sobre o efeito combinado desses inibidores.

Contudo é importante lembrar que PTEN não é o único regulador da via PI3K/AKT nas células T, SHIP1 também é capaz de converter PIP3 em PIP2. Níveis baixos de SHIP1 e inativação de PTEN foram descritos em LLA-T, desse modo podendo haver um efeito cooperativo dessas fosfatases para a hiperativação da via PI3K/AKT (Lo *et al.* 2009).

Subramaniam *et al.* (2012) mostraram que sem a regulação adequada PI3K γ e PI3K δ podem levar ao processo oncogênico em células progenitoras T e fornecem suficiente sinal de crescimento e sobrevivência celular para a manutenção das células do tumor. Dessa maneira reforçando o importante papel da regulação da via PI3K, e logo de PTEN.

Assim a restauração da atividade supressora tumoral de PTEN pode ser uma importante via no tratamento das LLA-T. Apesar da importância de PTEN como supressor tumoral, avanços na área de alvos terapêuticos ainda são pequenos (Song *et al.* 2012). Sugerimos como alvos terapêuticos a combinação de inibidores NOTCH1 e CK2 nas LLA-T pediátricas.

5- Conclusão

- 1- Mutações em PTEN ocorrem em 18% dos casos de LLA-T pediátrica e estão concentradas no éxon 7, caracterizando um *hot spot*.
- 2- A maioria (80%) dos pacientes PTEN mutados não atingiram a remissão clínica ao final da indução (D28) e apresentam menor Sobrevida Global.
- 3- Mutações de NOTCH1 regulam negativamente a expressão de PTEN em LLA-T primária.
- 4- Inibidores de NOTCH1 e CK2 combinados reduzem, de maneira sinérgica, a proliferação celular em linhagens de LLA-T e a viabilidade celular em LLA-T primária.

6- Referências

- 1- Adolfsson J, Månsson R, Buza-Vidas N, Hultquist A, Liuba K, *et al.* (2005) **Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential are vised road map for adult blood lineage commitment.** Cell 121(2): 295-306.
- 2- Aifantis I, Raetz E, Buonamici S. (2008) **Molecular pathogenesis of T-cell leukaemia and lymphoma.** Nature Reviews Immunology 8: 380-390.
- 3- Al-Khouri A M, Ma Y, Togo S H, Williams S, Mustelin T (2005) **Cooperative Phosphorylation of the Tumor Suppressor Phosphatase and Tensin Homologue (PTEN) by Casein Kinases and Glycogen Synthase Kinase 3 β .** The Journal of Biological Chemistry 280 (42): 35195–35202.
- 4- Anderson G, Harman B C, Hare K J, Jenkinson E J (2000) **Microenvironmental regulation of T cell evelopment in the thymus.** Seminars in Immunology. 12: 457–464.
- 5- Artavanis-Tsakonas S, Rand M D, Lake R J (1999) **Notch Signaling: Cell Fate Control and Signal Integration in Development.** Science 284: 770-776.
- 6- Asnafi V, Buzyn A, Le Noir S, Baleyrier F, Simon A, *et al.* (2005) **Impact of TCR status and genotype on outcome in adult T acute lymphoblastic leukemia: a LALA-94 study.** Blood.105: 3072-3078.
- 7- Astoul E, Edmunds C, Cantrell D A, Ward S G (2001). **PI 3-K and T-cell activation: limitations of T-leukemic cell lines as signaling models.** Trends Immunol. 22:490–496.
- 8- Barata J T, Silva A, Brandao J G, Nadler L M, Cardoso A A, Boussiotis V A. (2004) **Activation of PI3K is indispensable for Interleukin 7- mediated viability, proliferation, glucose use, and growth of T cell acute lymphoblastic leukemia cells.** J Exp Med 200:659-669.
- 9- Cantley L C & Neel B G, (1999) **New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinaseyAKT pathway.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 4240–4245.
- 10- Chiang M Y, Xu L, Shestova O, Histen G, L'Heureux S, *et al.* (2008). **Leukemia-associated NOTCH1 alleles areweak tumor initiators but accelerate K-ras–initiated leukemia.** The Journal of Clinical Investigation 118(9): 3181-3194.
- 11- Chung J, Ginn-Pease M E, Eng Charis (2005) **Phosphatase and Tensin Homologue Deleted on Chromosome 10 (PTEN) Has Nuclear Localization Signal–Like Sequences for Nuclear Import Mediated by Major Vault Protein.** Cancer Res 65(10): 4108-4116.
- 12- Clappier E, Gerby B, Sigaux F, Delord M, Touzri F, *et al.* (2011). **Clonal selection in xenografted human T cell acute lymphoblastic leukemia recapitulates gain of malignancy at relapse.** J. Exp. Med. 208(4):653-661.
- 13- Consolini R, Legitimo A, Rondelli R, Guglielmi C, Barisone E, *et al.* (1998) **Clinical relevance of CD10 expression in childhood ALL.** Haematologica 83:967-973.
- 14- Coustan-Smith E, Mullighan C G, Onciu M, Behm F G, Raimondi S C, *et al.* (2009) **Early T-cell precursor leukaemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukaemia.** Lancet Oncol. 10(2):147-56.

- 15- Cully, M., You, H., Levine, A.J., and Mak, T.W. (2006). **Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis.** *Nat Rev Cancer* 6:184-192.
- 16- Das S, Dixon J E, Cho W (2003) **Membrane-binding and activation mechanism of PTEN.** *Proc Natl Acad Sci U S A*.24;100(13):7491-7496.
- 17- Di Cristofano A B, Pesce C, Cordon-Cardo, Pandolfi P P (1998) **Pten is essential for embryonic development and tumour suppression.** *Nat. Genet.* 19:348–355.
- 18- Di Cristofano A, Kotsi P, Peng Y F, Cordon-Cardo C, Elkon K B, Pandolfi P P (1999) **Impaired Fas response and autoimmunity in Pten^{-/-} mice.** *Science.* 285:2122–2125.
- 19- Dumortier A, Jeannet R, Kirstetter P, Kleinmann E, Sellars M, *et al.* (2006) **Notch Activation Is an Early and Critical Event during T-Cell Leukemogenesis in Ikaros-Deficient Mice.** *Molecular and Cellular Biology* 26(1): 209–220.
- 20- Evangelisti C, Ricci F, Tazzari P, Tabellini G, Battistelli M, *et al.* (2011) **Targeted inhibition of mTORC1 and mTORC2 by active-site mTOR inhibitors has cytotoxic effects in T-cell acute lymphoblastic leukemia.** *Leukemia* 25: 781-791.
- 21- Ferrando A A, Neuberg D S, Staunton J, Loh M L, Huard C, *et al.* (2002) **Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia.** *Cancer Cell* 1: 75–87.
- 22- Larson Gedman A, Chen Q, Kugel Desmoulin S, Ge Y, LaFiura K *et al.* (2009) **The impact of NOTCH1, FBW7 and PTEN mutations on prognosis and downstream signaling in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia: A report from the Children's Oncology Group.** *Leukemia* 23:1417–1425.
- 23- Gil A, Andres-Pons A, Fernandez E, Valiente M, Torres J, *et al.* (2006) **Nuclear Localization of PTEN by a Ran-dependent Mechanism Enhances Apoptosis: Involvement of an N-Terminal Nuclear Localization Domain and Multiple Nuclear Exclusion Motifs.** *Molecular Biology of the Cell*: 17: 4002–4013.
- 24- Goldberg J M, Silverman L B, Levy D E, Dalton V K, Gelber R D, *et al.* (2003) **Childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: the Dana-Farber Cancer Institute acute lymphoblastic leukemia consortium experience.** *J Clin Oncol.* 21(19): 3616-3622.
- 25- Gordon W R, Arnett K L, Blacklow S C. (2008). **The molecular logic of Notch signaling -- a structural and biochemical perspective.** *J Cell Sci* 2008;121:3109-3119
- 26- Graux C, Cools J, Michaux L, Vandenberghe P, Hagemeijer A. (2006) **Cytogenetics and molecular genetics of T-cell acute lymphoblastic leukemia from thymocyte to lymphoblast.** *Leukemia* 20(9):1496-1510.
- 27- Grenman C, Stephens P, Smith R, Dalgliesh G L, Hunter C, Bignell G *et al.* (2007). **Patterns of somatic mutations in human cancer genomes.** *Nature* 446(7132):153-158.
- 28- Guidos C J (2006) **Synergy between the pre-T cell receptor and Notch: cementing the $\alpha\beta$ lineage choice.** *The Journal of Experimental Medicine* 203(10): 2233-2237.
- 29- Gutierrez A, Sanda T, Grebliunaite R, Carracedo A, Salmena L, *et al.* (2009) **High frequency of PTEN, PI3K, and AKT abnormalities in T-cell acute lymphoblastic leukemia.** *Blood.* 114(3):647-50.

- 30- Gutierrez A, Look AT. (2007) **NOTCH and PI3K-AKT Pathways Intertwined** Cancer Cell. 12(5): 411-3.
- 31- Heinzl K, Benz C, Martins V C, Haidl I D, Bleul C C (2007) **Bone marrow-derived hemopoietic precursors commit to the T cell lineage only after arrival in the thymic microenvironment.** J Immunol. 178(2): 858-68.
- 32- Hsu J, Shi Y, Krajewski S, Renner S, Fisher M, Reed J C, *et al.* (2001). **The AKT kinase is activated in multiple myeloma tumor cells.** Blood. 98:2853–2855.
- 33- Kebriaei P, Anastasi J, Larson R A, (2003) **Acute lymphoblastic leukemia: diagnosis and classification.** Best Practice & Research Clinical Haematology 15(4): 597-621.
- 34- Kimberly W T & Wolfe M S (2003) **Identity and Function of γ -Secretase** Journal of Neuroscience Research 74:353–360
- 35- Kraszewska M D, Dawidowska M, Szczepanski T, Witt M (2012) **T-cell acute lymphoblastic leukaemia: recent molecular biology findings.** Br J Haematol. 156(3):303-15.
- 36- Kuo T C & Schlissel M S (2009) **Mechanisms controlling expression of the RAG locus during lymphocyte development.** Current Opinion in Immunology 21:173–178
- 37- Lee J, Yang H, Georgescu M, Cristofano A D, Maehama T, *et al.* (1999) **Crystal Structure of the PTEN Tumor Suppressor: Implications for Its Phosphoinositide Phosphatase Activity and Membrane Association.** Cell 99: 323–334
- 38- Lewis H D, Leveridge M, Strack P R, Haldon C D, O'Neil J, *et al.* (2007) **Apoptosis in T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Cells after Cell Cycle Arrest Induced by Pharmacological Inhibition of Notch Signaling.** Chemistry & Biology 14: 209–219.
- 39- Lindsay Y, McCoull D, Davidson L, Leslie N R, Fairservice A, *et al.* (2006) **Localization of agonist-sensitive PtdIns(3,4,5)P₃ reveals a nuclear pool that is insensitive to PTEN expression.** Journal of Cell Science 119 (24): 5160-5168.
- 40- Lo T C , Barnhill L M, Kima Y, Nakaea E A, Yub A L, Dicciannia M B (2009) **Inactivation of SHIP1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia due to mutation and extensive alternative splicing.** Leukemia Research 33: 1562–1566.
- 41- Martelli A M, Chiarini F, Evangelisti C, Cappellini A, Buontempo F, *et al.* (2012) **Two hits are better than one: targeting both phosphatidylinositol 3-kinase and mammalian target of rapamycin as a therapeutic strategy for acute leukemia treatment.** Oncotarget 3: 371-394
- 42- Maser RS, Choudhury B, Campbell P J, Feng B, Wong K K, *et al.* (2007) **Chromosomally unstable mouse tumours have genomic alterations similar to diverse human cancers.** Nature 447: 966-971.
- 43- O'Neil J, Shank J, Cusson N, Murre C, Kelliher M (2004) **TAL1/SCL induces leukemia by inhibiting the transcriptional activity of E47/HEB.** Cancer Cell 5: 587-596.
- 44- Palomero T, Lim W K, Odom D T, Sulis M L, Real P J, *et al.* (2006) **NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth.** Proc. Natl. Acad. Sci 103(48): 18261–18266.

- 45- Palomero T, Sulis M L, Cortina M, Real P J, Barnes K, *et al.* (2007) **Mutational loss of PTEN induces resistance to NOTCH1 inhibition in T-cell leukemia.** *Nature Medicine* 13(10):1203-1210.
- 46- Palomero T, Dominguez M, Ferrando A A (2008) **The role of the PTEN/AKT pathway in NOTCH1-induced leukemia.** *Cell Cycle* 7(8): 965-970.
- 47- Palomero T & Ferrando A (2008) **Oncogenic NOTCH1 Control of MYC and PI3K: Challenges and Opportunities for Anti-NOTCH1 Therapy in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemias and Lymphomas.** *Clin Cancer Res* 14(17): 5315-5317.
- 48- Pear W S, Aster J C, Scott, M L, Hasserjian R E, Softer B, *et al.* (1996). **Exclusive Development of T cell Neoplasms in Mice Transplanted with Bone Marrow Expressing Activated Notch Alleles.** *J. Exp. Med.* 183: 2283-2291.
- 49- Pieters R & Carroll W L (2008) **Biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia.** *Pediatric Clinics of North America*.55: 1–20.
- 50- Pui J C, Allman D, Xu L, DeRocco S, Kadesch T, *et al.* (1999) **NOTCH1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination.** *Immunity* 11: 299-308.
- 51- Pui CH & Evans W E (2006) **Treatment of acute lymphoblastic leukemia.** *The New England Journal of Medicine* 354(2): p. 166-178.
- 52- Radtke F, Wilson A, Stark G, Bauer M, van Meerwijk J, *et al.* (1999). **Deficient T Cell Fate Specification in Mice with an Induced Inactivation of NOTCH1.** *Immunity* 10: 547–558.
- 53- Rodewald H-R (2008) **Thymus Organogenesis.** *Annu. Rev. Immunol.* 26: 355–388
- 54- Rothenberg E V, Moore J E, and Yui M A (2008) **Launching the T-Lineage Developmental Programme** *Nat Rev Immunol.* 8(1): 9–21.
- 55- Samon J B, Castillo-Martin M, Hadler M, Ambesi-Impiobato A, Paietta E, (2012) **Preclinical Analysis of the γ -Secretase Inhibitor PF-03084014 in Combination with Glucocorticoids in T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia.** *Mol Cancer Ther* 11(7): 1565-1575.
- 56- Sansal I & Sellers W R (2004) **The Biology and Clinical Relevance of the PTEN Tumor Suppressor Pathway.** *Journal of Clinical Oncology* 22(14): 2955-2963.
- 57- Schade A E, Powers J J, Wlodarski M W, Maciejewski J P. (2006). **Phosphatidylinositol-3-phosphate kinase pathway activation protects leukemic large granular lymphocytes from undergoing homeostatic apoptosis.** *Blood.* 107:4834–4840.
- 58- Schmitt, T M, Ciofani M, Petrie H T, Zuniga-Pflucker J C (2004) **Maintenance of T cell specification and differentiation requires recurrent notch receptor-ligand interactions.** *J Exp Med.* 200:469-479.
- 59- Scrideli C A, Assumpção J G, Ganazza M A, Araújo M, Toledo S R, *et al.* (2009) **A simplified minimal residual disease polymerase chain reaction method at early treatment points can stratify children with acute lymphoblastic leukemia into good and poor outcome groups.** *Haematologica* 94(6): 781–789.
- 60- Shen W H, Balajee A S, Wang J, Wu H, Eng C, Pandolfi P P, Yin Y (2007) **Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity.** *Cell* 128(1):157-170.

- 61- Silva A, Yunes J A, Cardoso B A, Martins L R, Jotta P Y, *et al.* (2008) **PTEN posttranslational inactivation and hyperactivation of the PI3K/AKT pathway sustain primary T cell leukemia viability.** J Clin Invest. 118(11):3762-3774.
- 62- Song M S, Salmena L, Pandolfi P P. (2012) **The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor.** Nature Reviews-Molecular Cell Biology 13: 283-296
- 63- Struhl G & Adachi A (1998) **Nuclear Access and Action of Notch In Vivo.** Cell 93: 649–660.
- 64- Subramaniam P S, Whye D W, Efimenko E, Chen J, Tosello V, (2012) **Targeting nonclassical oncogenes for therapy in T-ALL.** Cancer Cell. 21(4): 459-72.
- 65- Sulis M L, Williams O, Palomero T, Tosello V, Pallikuppam S, *et al.* (2008) **NOTCH1 extracellular juxtamembrane expansion mutations in T-ALL.** Blood 112(3):733-40
- 66- Suzuki A, de la Pompa J L, Stambolic V, Elia A J, Sasaki T, *et al.* (1998). **High cancer susceptibility and embryonic lethality associated with mutation of the PTEN tumor suppressor gene in mice.** Curr. Biol. 8:1169–1178.
- 67- Takahama Y (2006) **Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection.** Nat Rev Immunol. 6 (2):127-135.
- 68- Thompson B J, Buonamici S, Sulis M L, Palomero T, Vilimas T, *et al.* (2007) **The SCF FBW7 ubiquitin ligase complex as a tumor suppressor in T cell leukemia.** The Journal of Experimental Medicine 204(8): 1825-1835.
- 69- Trotman L C, Wang X, Alimonti A, Chen Z, Teruya-Feldstein J, *et al.* (2007) **Ubiquitination regulates PTEN nuclear import and tumor suppression.** Cell. 128(1):141-156.
- 70- Uckun F M, Gaynon P S, Sensel M G, Nachman J, Trigg M E, *et al.* (1997) **Clinical features and treatment outcome of childhood T lineage acute lymphoblastic leukemia according to the apparent maturational stage of T lineage leukemic blasts: a Children's Cancer Group study.** J. Clin. Oncol. 15, 2214–2221.
- 71- Van Vlierberghe P, Palomero T, Khiabani H, Van der Meulen J, Castillo M, (2010) **PHF6 mutations in T-cell acute lymphoblastic leukemia.** Nat Genet. 42(4):338-342.
- 72- Vilimas T, Mascarenhas J, Palomero T, Mandal M, Buonamici S, *et al.* (2007) **Targeting the NF- κ B signaling pathway in NOTCH1-induced T-cell leukemia.** Nature Medicine 13(1): 70-77.
- 73- Vivanco L & Sawyers C L, (2002) **The phosphatidylinositol 3-kinase–AKT pathway in human cancer.** Nature Reviews - Cancer 2: 489-501.
- 74- Xu Q, Simpson S E, Scialla T J, Bagg A, Carroll M. (2003). **Survival of acute myeloid leukemia cells requires PI3 kinase activation.** Blood. 102:972–980.
- 75- Yasutomo K, Doyle C, Miele L, Germain R (2000) **The duration of antigen receptor signalling determines CD4+ versus CD8+ T-cell lineage fate.** Nature 404: 506-510.
- 76- Washburn T, Schweighoffer E, Gridley T, Chang D, Fowlkes B J, *et al.* (1997) **Notch Activity Influences the ab versus gd T Cell Lineage Decision.** Cell 88: 833-843.
- 77- Whelan J T, Forbes S L, Bertrand F E (2007) **CBF-1 (RBP-J κ) Binds to the PTEN Promoter and Regulates PTEN Gene Expression.** Cell Cycle 6(1): 80-84.

- 78- Welch H, Eguinoa A, Stephens L R, Hawkins P T(1998) **Protein Kinase B and Rac Are Activated in Parallel within a Phosphatidylinositide 3OH-kinase-controlled Signaling Pathway.** The Journal of Biological Chemistry 273(18): 11248–11256.
- 79- Weng A P, Ferrando A A, Lee W, Morris IV J P, Silverman L B, *et al.* (2004). **Activating Mutations of NOTCH1 in Human T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia.** Science 306: 269-271.
- 80- Zhang J, Grindley J C, Yin T, Jayasinghe S, He X C, *et al.* (2006). **PTEN maintains haematopoietic stem cells and acts in lineage choice and leukaemia prevention.** Nature 441:518-522.
- 81- Zhang J, Ding L, Holmfeldt L, Wu G, Heatley S L, *et al.* (2012) **The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia.** Nature 481(7380):157-163.
- 82- Zenatti PP, Ribeiro D, Li W, Zuurbier L, Silva MC, *et al.* (2011) **Oncogenic IL7R gain-of-function mutations n childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia.** Nature Genetics, 4;43(10):924-941.

7- Anexo: Comprovante de aprovação do Comitê de Ética Local

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha tese de Doutorado intitulada "Mutações de PTEN em Leucemias Linfóides Agudas T" faz parte do projeto de pesquisa intitulado "Microambiente da medula óssea e pi3k na resistência a drogas da leucemia linfóide aguda pediátrica" que:

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

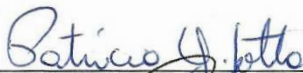
Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

() CIBio – Comissão Interna de Biossegurança, projeto No. _____, Instituição: _____

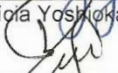
() CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais, projeto No. _____, Instituição: _____

(x) CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. 1105/2008, Instituição: Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*



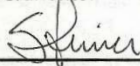
Aluno: Patrícia Yoshikawa Jotta



Orientador: José Andres Yunes

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(x) Deferido () Indeferido



Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
Presidente do
Comitê de Ética em Pesquisa
FCM/UNICAMP
Matrícula: 28856-6

Carimbo e assinatura

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura