



ANDRÉ BORTOLINI SILVEIRA

“INIBIÇÃO DA VIA PI3K NA LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA T  
PEDIÁTRICA: RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA E  
IMPLICAÇÕES CLÍNICAS”

“*PI3K INHIBITION IN CHILDHOOD T-CELL ACUTE  
LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA: RESPONSE TO  
CHEMOTHERAPY AND CLINICAL IMPLICATIONS*”

CAMPINAS  
2013





UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA



ANDRÉ BORTOLINI SILVEIRA

“INIBIÇÃO DA VIA PI3K NA LEUCEMIA LINFOIDE  
AGUDA T PEDIÁTRICA: RESPOSTA À  
QUIMIOTERAPIA E IMPLICAÇÕES CLÍNICAS”

“PI3K INHIBITION IN CHILDHOOD T-CELL ACUTE  
LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA: RESPONSE TO  
CHEMOTHERAPY AND CLINICAL IMPLICATIONS”

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Genética e Biologia Molecular na área de Genética Animal e Evolução.

*Doctorate thesis presented to the Genetics and Molecular Biology Post Graduation Programme of the Biology Institute of the State University of Campinas to obtain the Ph.D. grade in Genetics and Molecular Biology in the area of Animal Genetics and Evolution.*

Orientador: José Andrés Yunes  
Co-orientador: Nilson Ivo Tonin Zanchin

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL  
DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO ANDRÉ  
BORTOLINI SILVEIRA E ORIENTADA PELO PROF. DR.  
JOSÉ ANDRÉS YUNES.

CAMPINAS  
2013

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Biologia  
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

Silveira, André Bortolini, 1987-  
Si39i Inibição da via PI3K na leucemia linfoide aguda T pediátrica : resposta à quimioterapia e implicações clínicas / André Bortolini Silveira. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: José Andrés Yunes.  
Coorientador: Nilson Ivo Tonin Zanchin.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Proteínas PI3K/Akt. 2. Leucemia Aguda. 3. Câncer - Quimioterapia. 4. Glucocorticoides. 5. Metotrexato. I. Yunes, José Andrés. II. Zanchin, Nilson Ivo Tonin. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** PI3K inhibition in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia : response to chemotherapy and clinical implications

**Palavras-chave em inglês:**

PI3K/Akt proteins

Leukemia, Acute

Cancer - Chemotherapy

Glucocorticoids

Methotrexate

**Área de concentração:** Genética Animal e Evolução

**Titulação:** Doutor em Genética e Biologia Molecular

**Banca examinadora:**

José Andrés Yunes [Orientador]

Carlos Alberto Scrideli

Leticia Fröhlich Archangelo

Guido Lenz

Maria do Socorro Pombo de Oliveira

**Data de defesa:** 16-12-2013

**Programa de Pós-Graduação:** Genética e Biologia Molecular

## BANCA EXAMINADORA

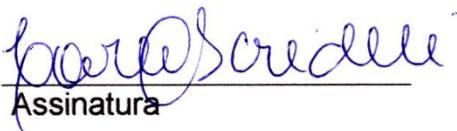
Prof. Dr. José Andrés Yunes (Orientador)



---

Assinatura

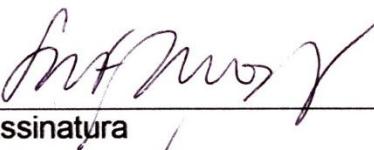
Prof. Dr. Carlos Alberto Scrideli



---

Assinatura

Profa. Dra. Letícia Fröhlich Archangelo



---

Assinatura

Prof. Dr. Guido Lenz



---

Assinatura

Profa. Dra. Maria do Socorro Pombo de Oliveira



---

Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Verjovski-Almeida

---

Assinatura

Profa. Dra. Katlin Brauer Massirer

---

Assinatura

Prof. Dr. Jörg Kobarg

---

Assinatura



## **RESUMO**

A via PI3K está frequentemente hiperativada em células primárias de leucemia linfoide aguda T (LLA-T) pediátrica, característica previamente associada à resistência a glucocorticoides. Pacientes cujas células leucêmicas apresentam mutações em *PTEN*, o principal regulador negativo de PI3K, podem apresentar maior risco de falha na terapia de indução e recaída. Neste estudo, uma assinatura baseada em expressão gênica foi utilizada para acessar o nível de ativação da via PI3K em amostras diagnósticas de LLA-T. Nós identificamos Myc como um importante integrador da atividade de sinalização por PI3K e observamos que maior atividade da via está associada à resistência a glucocorticoides e pior prognóstico. O inibidor de PI3K AS605240 mostrou atividade antileucêmica e forte sinergismo com glucocorticoides tanto *in vitro* como em um modelo xenográfico de LLA-T em camundongos NOD/SCID. Em contraste, a inibição de PI3K resultou em antagonismo com metotrexato e daunorubicina, drogas que atuam preferencialmente em células em divisão. Esta interação antagonista, no entanto, pode ser revertida pelo uso de um esquema temporal específico de administração das drogas. Nossos dados indicam os potenciais benefícios e limitações para a incorporação de inibidores de PI3K na terapia da LLA-T.



## ABSTRACT

The PI3K pathway is frequently hyperactivated in primary T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) cells. Activation of the PI3K pathway has been suggested as one mechanism of glucocorticoid resistance in T-ALL, and patients harboring mutations in the PI3K negative regulator *PTEN* may be at increased risk of induction failure and relapse. In this study, a PI3K gene expression signature was used as readout of PI3K activity in diagnostic T-ALL samples. We identified Myc as an important downstream integrator of PI3K pathway activity in T-ALL and found that higher PI3K activity is associated with glucocorticoid resistance and worse clinical outcome. The PI3K inhibitor AS605240 showed anti-leukemic activity and strong synergism with glucocorticoids both *in vitro* and in a NOD/SCID xenograft model of T-ALL. In contrast, PI3K inhibition showed antagonism with methotrexate and daunorubicin, drugs that preferentially target dividing cells. This antagonistic interaction, however, could be circumvented by the use of correct drug scheduling schemes. Our data indicate the potential benefits and difficulties for the incorporation of PI3K inhibitors in T-ALL therapy.



## **AGRADECIMENTOS**

Dentro do contexto de suporte pessoal que viabilizou este doutorado se destacam minha família, professores, amigos e colegas de profissão. Todos contribuíram cooperativamente para minha formação pessoal e acadêmica, desde o período escolar até os últimos anos deste doutorado, através de influências que tangem desde as estruturas básicas do raciocínio lógico até aspectos mais subjetivos da inteligência afetiva.

Me referindo especificamente a este doutorado, foram imprescindíveis o apoio institucional do Centro Infantil Boldrini, Universidade Estadual de Campinas, Laboratório Nacional de Biociências e o suporte financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. A orientação do Dr. José Andrés Yunes sempre foi pautada pelo desenvolvimento de um trabalho de qualidade, direcionando a curiosidade científica em força motriz para a obtenção de respostas biológicas e clínicas relevantes. A proximidade com o Dr. João Taborda Barata, da Universidade de Lisboa, ofereceu oportunidades ímpares de aprendizado.

Destacam-se como merecedores de agradecimento os pacientes de câncer pediátrico e suas famílias. Eles são ao mesmo tempo o cerne e o objetivo de nossa pesquisa.



# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Leucemia linfoide aguda .....	1
1.2 Tratamento da leucemia linfoide aguda .....	2
1.3 Leucemia linfoide aguda T-derivada .....	5
1.4 Via de sinalização PI3K .....	7
1.5 Inibição de PI3K .....	9
2. OBJETIVOS .....	11
3. RESULTADOS .....	13
CAPÍTULO I: ARTIGO SUBMETIDO PARA A REVISTA LEUKEMIA .....	13
3.1 ABSTRACT .....	14
3.2 INTRODUCTION.....	15
3.3 METHODS .....	16
3.3.1 Synthesis of AS605240.....	16
3.3.2 Primary T-ALL cells.....	16
3.3.3 Cell lines culture and survival assays .....	17
3.3.4 PI3K gene expression signatures .....	17
3.3.5 Gene expression of diagnostic T-ALL .....	18
3.3.6 Cell signaling assays .....	18
3.3.7 Cell size analysis .....	19
3.3.8 Apoptosis analysis .....	19
3.3.9 Cell cycle and Brdu incorporation assays .....	19
3.3.10 In vivo experiments .....	20
3.4 RESULTS .....	21
3.4.1 PI3K activity is associated with increased chemotherapy resistance and poor prognosis in T-ALL.....	21
3.4.2 The PI3K inhibitor AS605240 shows anti-leukemic activity and prevents leukemic progression in T-ALL engrafted NOD/SCID mice .....	31
3.4.3 AS605240 synergizes with glucocorticoids both in vitro and in a mouse xenograft model of T-ALL .....	33

3.4.4 PI3K inhibition requires scheduling when combined with drugs that target dividing cells .....	37
3.5 DISCUSSION.....	40
3.6 ACKNOWLEDGEMENTS .....	44
CAPÍTULO II: EXPERIMENTOS COMPLEMENTARES .....	45
3.7 MÉTODOS COMPLEMENTARES .....	45
3.7.1 Classificação segundo subtipos moleculares de LLA-T.....	45
3.7.2 Western blotting.....	45
3.7.3 PCR quantitativo.....	46
3.8 RESULTADOS COMPLEMENTARES.....	47
3.8.1 Associação entre atividade de PI3K e subtipos moleculares de LLA-T .	47
3.8.2 Respostas de feedback perante inibição de PI3K .....	49
3.8.3 AS605240 induz expressão de histonas dependentes de replicação ....	52
4. DISCUSSÃO GERAL .....	55
5. CONCLUSÕES .....	68
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	70
ANEXO 1 .....	82
ANEXO 2 .....	85
ANEXO 3 .....	86
ANEXO 4 (Supplementary Table 1) .....	87
ANEXO 5 (Supplementray Table 2) .....	90

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> A via de sinalização Notch1 .....	7
<b>Figura 2.</b> Inibidor de PI3K AS605240. ....	10
<b>Supplementary Figure 1.</b> T-ALL samples responded similarly to PI3K inhibition, irrespectively of <i>PTEN</i> and <i>NOTCH1</i> mutational status. ....	22
<b>Figure 1.</b> PI3K inhibition downregulates Myc in a Notch1-independent manner and is associated to glucocorticoid sensitivity .....	23
<b>Supplementary Figure 2.</b> AS605240-derived gene expression signature correlated with signatures of other PI3K pathway inhibitors .....	24
<b>Supplementary Figure 3.</b> AS605240 downregulated a gene set of Notch1-responsive genes, characterized by the presence of several Myc targets .....	25
<b>Supplementary Figure 4.</b> AS605240 modulates the expression of genes related to cholesterol biosynthesis .....	26
<b>Figure 2.</b> PI3K activity is associated with worse clinical outcome in T-ALL .....	30
<b>Figure 3.</b> AS605240 inhibited p-Akt and PIP <sub>3</sub> accumulation in T-ALL and showed anti-leukemic activity both <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> .....	32
<b>Supplementary Figure 5.</b> IC <sub>50</sub> values of AS605240 for different T-ALL cell lines	33
<b>Supplementary Figure 6.</b> AS605240 treatment reduces leukemic cell size .....	34
Figure 4. AS605240 shows a synergistic interaction with prednisolone .....	35
<b>Supplementary Figure 7.</b> Relative weight of T-ALL xenografted NOD/SCID mice treated with vehicle, AS605240 and/or dexamethasone .....	36
<b>Figure 5.</b> AS605240 showed an antagonistic interaction with MTX, which could be successfully circumvented by means of proper drug scheduling.....	38
<b>Supplementary Figure 8.</b> All p110 catalytic subunits of PI3K ( <i>PIK3CA</i> , <i>PIK3CB</i> , <i>PIK3CD</i> and <i>PIK3CG</i> ) are highly expressed in primary T-ALL.....	41
<b>Figure 6.</b> Interplay between Notch1 and PI3K pathways in T-ALL.....	42
<b>Figura 3.</b> Subtipos moleculares de 24 amostras de LLA-T ao diagnóstico segundo dados de expressão global.....	48
<b>Figura 4.</b> Subtipos moleculares de LLA-T não estão associados ao score de atividade de PI3K .....	48
<b>Figura 5.</b> AS605240 modula a fosforilação de diversos componentes das vias Raf/Mek/Erk e CREB1/CREM/ATF1 .....	50

<b>Figura 6.</b> AS605240 induz a transcrição de alvos de CREB1 em linhagens de LLA-T .....	51
<b>Figura 7.</b> Os sítios de fosforilação de CREB1 (Ser133), CREM (Ser87) e ATF1 (Ser63) apresentam alta similaridade na sequência de aminoácidos .....	51
<b>Figura 8.</b> AS605240 induz a expressão de diversos genes de histonas dependentes de replicação .....	53
<b>Figura 9.</b> AS605240 induz a expressão de RNAm poliadenilado de genes de histonas dependentes de replicação .....	54
<b>Figura 10.</b> Interação entre vias de sinalização PI3K e Ras/Raf/Mek/Erk.....	62

## LISTA DE TABELAS

<b>Supplementary Table 3.</b> Clinical and biological features of the 24 T-ALL cases included in expression microarray analysis. ....	28
<b>Supplementary Table 4.</b> Ranking of diagnostic T-ALL samples according to the "IL7R mutated score" successfully clustered <i>IL7R</i> mutated samples. ....	29
<b>Table 1.</b> Combination Index (CI) between AS605240 and methotrexate (MTX), prednisolone (Pred), asparaginase (Asp) or daunorubicin (DNR) in T-ALL cell lines. ....	36
<b>Table 2.</b> AS605240 induces G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> cell cycle arrest and reduces BrdU nucleotide incorporation in T-ALL cell lines. ....	39
<b>Anexo 4 (Supplementary Table 1)</b> .....	87
<b>Anexo 5 (Supplementray Table 2)</b> .....	90



## LISTA DE ABREVIATURAS

Akt - *Protein kinase B*

ATF1 - *Activating transcript factor 1*

BRD4 - *Bromodomain-containing protein 4*

BSA - Albumina do soro bovino

CI - Índice de Combinação /*Combination Index()*

CK2 - *Casein kinase 2*

CMap - *Connectivity Map Analysis*

CRE - *cAMP-response element*

CREB1 - *cAMP responsive element binding protein 1*

CREM - *cAMP-responsive element modulator*

DHFR - *Dihydrofolate reductase*

DNR - Daunorrubicina/*Daunorubicin*

ETP-ALL - Precursoras iniciais de células T

FBS - Soro fetal bovino/*Fetal bovine serum*

GPCRs - Receptores transmembrana acoplados à proteína G

GSEA - *Gene Set Enrichment Analysis*

GSI - Inibidor de  $\gamma$ -secretase/ $\gamma$ -*secretase inhibitor*

HDE - *Histone downstream element*

*HOX11/TLX1* - *Homeobox-11*

ICN1 - Notch1 intracelular

*IL7R* - *Interleukin-7 receptor*

*INK4/CDKN2A* - *Inhibitors of CDK4*

IPA - *Ingenuity Pathway Analysis*

LLA - Leucemia linfoide aguda/*Acute lymphoblastic leukemia*

LLA-B - LLA B-derivada

LLA-T - LLA T-derivada/*T-cell acute lymphoblastic leukemia*

*LYL1* - *Lymphoblastic leukaemia-derived sequence 1*

MAP - *Mitogen activated proteins*

MAPKKKs - *MAP kinase kinases kinases*

MAPKKs - *MAP kinase kinases*

MAPKs - *MAP kinase*

MLL - *Mixed-lineage leukaemia*

mTOR - *Mammalian target of rapamycin*

MTX - Metotrexato/*Methotrexate*

*MYB* - *V-myb myeloblastosis viral oncogene homolog*

PCA - Análise de Componentes Principais/*Principal Component Analysis*

PH - *Pleckstrin homology domain*

PI - Iodeto de propídeo/*Propidium iodide*

PI3K - *Phosphatidyl inositol 3-kinase*

PIP<sub>2</sub> - *Phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate*

PIP<sub>3</sub> - *Phosphatidyl inositol 3,4,5-trisphosphate*

PTEN - *Phosphatase and tensin homologue*

RB - *Retinoblastoma*

SIL - *SCL-interrupting locus*

SLBP - *Stem-loop binding protein*

SNC - Sistema nervoso central

*TAL1* - *T-cell acute lymphocytic leukaemia 1*

TCR - Receptores de células T

U7 snRNPs - *U7 small nuclear RNAs*

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Leucemia linfoide aguda

A Leucemia Linfoide Aguda (LLA), uma doença caracterizada pela transformação maligna de progenitores linfoideos na medula óssea, afeta tanto crianças como adultos, com um pico de prevalência entre 2 a 5 anos de idade.<sup>1</sup> A LLA é o tipo de câncer mais comum na infância, correspondendo a cerca de 25% de todos os casos de câncer e a 80% de todas as leucemias que ocorrem até a idade de 15 anos.

Apenas uma pequena parcela dos casos de LLA (<5%) está associada com exposição à radiação ionizante e a certos quimioterápicos ou com síndromes genéticas hereditárias que predispõem os portadores a desenvolver a doença, como a Síndrome de Down, Síndrome de Bloom, Ataxia-telangiectasia e Síndrome de Quebra de Nijmegen.<sup>1</sup> A LLA se origina a partir do acúmulo de diversas lesões genéticas em progenitores hematopoéticos comprometidos com a linhagem linfoide. Em alguns casos, a primeira mutação no processo multievento que leva à transformação oncogênica pode ocorrer em células-tronco hematopoéticas ou progenitores hematopoéticos com potencial de diferenciação multilinhagem.<sup>2,3</sup> Entre as alterações genéticas encontradas em células leucêmicas, podem ser citadas a expressão aberrante de proto-oncogenes, translocações cromossômicas que geram genes de fusão codificadores de proteínas quinase constitutivamente ativas ou fatores de transcrição com função alterada, hiperdiploidia e hipodiploidia.<sup>4,5</sup> Estas alterações genéticas são frequentemente capazes de subverter o controle de proliferação celular, promover resistência a sinais pró-apoptóticos e bloquear a diferenciação, acarretando em manutenção ou incremento da capacidade de autorrenovação.<sup>5,6</sup>

As células implicadas na LLA possuem rearranjos clonais em genes de imunoglobulinas e receptores de células T, além de expressarem receptores de

antígenos e proteínas de superfície associadas à diferenciação celular, recapitulando estágios de diferenciação observados no desenvolvimento normal de linfócitos B ou T.<sup>5,7,8</sup> Imunofenotipagem por citometria de fluxo é essencial para estabelecer o diagnóstico correto e definir a linhagem celular do clone leucêmico, sendo que a célula leucêmica pode ser subclassificada de acordo com os diversos passos de diferenciação de células B ou T. No entanto, os únicos fenótipos com importância terapêutica são aqueles que definem células T-derivadas, células B maduras, células B precursoras<sup>6,9</sup> e, mais recentemente identificadas, precursoras iniciais de células T (ETP-ALL).<sup>10</sup>

## **1.2 Tratamento da leucemia linfoide aguda**

A taxa de sucesso no tratamento de LLA sofreu constantes incrementos desde a década de 1960, atingindo taxas de sobrevida livre de eventos em 5 anos próximas de 80% nos protocolos de tratamento modernos em centros especializados. A melhora no prognóstico das crianças indica o progresso no desenvolvimento de estratégias de tratamento efetivas para subtipos resistentes da doença, incluindo a combinação de múltiplos agentes antineoplásicos, tratamento do sistema nervoso central (SNC) em leucemias pré-sintomáticas e terapia intensiva para pacientes com alto risco de recaída.<sup>6,11,12</sup>

Os protocolos de tratamento de LLA tipicamente consistem em uma fase de indução à remissão, uma fase de intensificação do tratamento (ou consolidação) e por fim uma fase de manutenção, que visa eliminar a doença residual. O tratamento é também direcionado ao SNC logo no início da intervenção clínica, visando à prevenção de recaídas possivelmente originárias de células leucêmicas alojadas neste sítio. O objetivo principal da terapia de indução é erradicar mais de 99% da população leucêmica e recuperar a hematopoese normal na medula óssea. Esta fase em geral inclui a administração de um glucocorticóide (prednisona ou dexametasona), vincristina e ao menos uma terceira droga (asparaginase, antracíclicos ou ambos).<sup>1,11</sup> A inclusão de ciclofosfamida e o

tratamento intensivo com asparaginase são frequentemente considerados como benéficos para pacientes de LLA-T.<sup>13</sup> O grupo de estudo ALL-BFM definiu a relevância da resposta inicial a uma pré-fase de tratamento, caracterizada por 7 dias de prednisona e uma injeção intratecal de metotrexato (MTX) no dia 1. Resistência *in vivo* a prednisona foi capaz de definir um grupo de pacientes com alto risco de recaída e baixa sobrevida,<sup>14</sup> levando a estratégias de intensificação de terapia para estes pacientes.<sup>15</sup>

A fase de intensificação é voltada para a erradicação de células leucêmicas resistentes ao tratamento inicial. Estratégias para esta fase incluem MTX em alta dose mais mercaptopurina, reindução com os mesmos agentes utilizados no início do tratamento, pulsos de vincristina e glucocorticóides mais asparaginase em alta dose ou um regime que consiste em terapia de reindução com doses adicionais de vincristina, asparaginase e MTX intravenoso. Por motivos ainda não claros, pacientes com LLA necessitam da terapia de manutenção para prevenir recaídas. Mercaptopurina diária e MTX a cada semana constituem a estrutura básica dos regimes de manutenção.<sup>1,11,13</sup>

Recaída no SNC se caracteriza como um grande obstáculo para a cura da LLA.<sup>16-18</sup> Imunofenótipo de células T-derivadas, entre outros fatores, está associado a um risco elevado de recaída no SNC.<sup>19</sup> Atualmente, em função das complicações tanto agudas como a longo prazo, a irradiação cranial é somente realizada em pacientes com alto risco de recaída no SNC.<sup>19</sup> Ainda, no contexto de protocolos baseados em quimioterapia sistêmica intensiva, as doses utilizadas para irradiação puderam ser consideravelmente reduzidas.<sup>14</sup> Todos os regimes de tratamento de LLA incluem quimioterapia intratecal, que é geralmente iniciada na indução, intensificada durante a consolidação e, em muitos protocolos, continuada durante a manutenção. A terapia intratecal pode consistir no uso de metotrexato sozinho ou na combinação de metotrexato, citarabina e um corticóide.<sup>20</sup>

A possibilidade de se adicionar a LLA na crescente lista de cânceres efetivamente curáveis com terapia é tentadora, levando em conta as altas taxas de sobrevida livre de eventos observadas em centros especializados de

tratamento, que proporcionam uma vida saudável e produtiva para a maioria dos pacientes.<sup>1,11</sup> Neste contexto, o futuro do tratamento da doença seria baseado no simples ajuste dos protocolos atuais, com indicação de regimes de tratamento alternativos para os 20% dos pacientes com pior resposta aos quimioterápicos atualmente utilizados. Este cenário, no entanto, pode ser rejeitado em vista da complexidade, custo elevado e efeitos tóxicos resultantes da terapia baseada no uso combinado de múltiplas drogas.<sup>1,11</sup> Ainda, esta visão subestima a capacidade crescente de análise das anormalidades genéticas e epigenéticas das células leucêmicas e o uso dessa informação para o desenvolvimento de melhores métodos diagnósticos e novas terapias baseadas em alvos moleculares específicos.<sup>5</sup> Desta maneira, o tema dominante na pesquisa contemporânea da patobiologia da LLA se baseia no entendimento dos efeitos celulares resultantes das lesões genéticas mais frequentemente encontradas na LLA, no que se refere a proliferação, diferenciação e sobrevivência, visando a seleção de alvos moleculares aos quais as células leucêmicas são dependentes.<sup>21</sup>

Falhas no tratamento têm sido associadas à resistência intrínseca ou adquirida a múltiplos agentes anti-neoplásicos. Este fato sugere que a intensificação do tratamento com os mesmos agentes quimioterápicos já utilizados seja improvável de melhorar as taxas de cura substancialmente, ainda podendo acarretar em aumento de mortalidade por toxicidade e risco ao desenvolvimento de segundas neoplasias relacionadas ao tratamento.<sup>5</sup> Pacientes com LLA resistente à quimioterapia possuem péssimo prognóstico, indicando a necessidade de identificação dos mecanismos moleculares que suportam o fenótipo de resistência. Sob esta perspectiva, diversos trabalhos identificaram genes possivelmente relacionados à resistência ou à sensibilidade à quimioterapia, demonstrando haver associação entre o perfil de expressão gênica ao diagnóstico e a resposta clínica dos pacientes.<sup>22-31</sup>

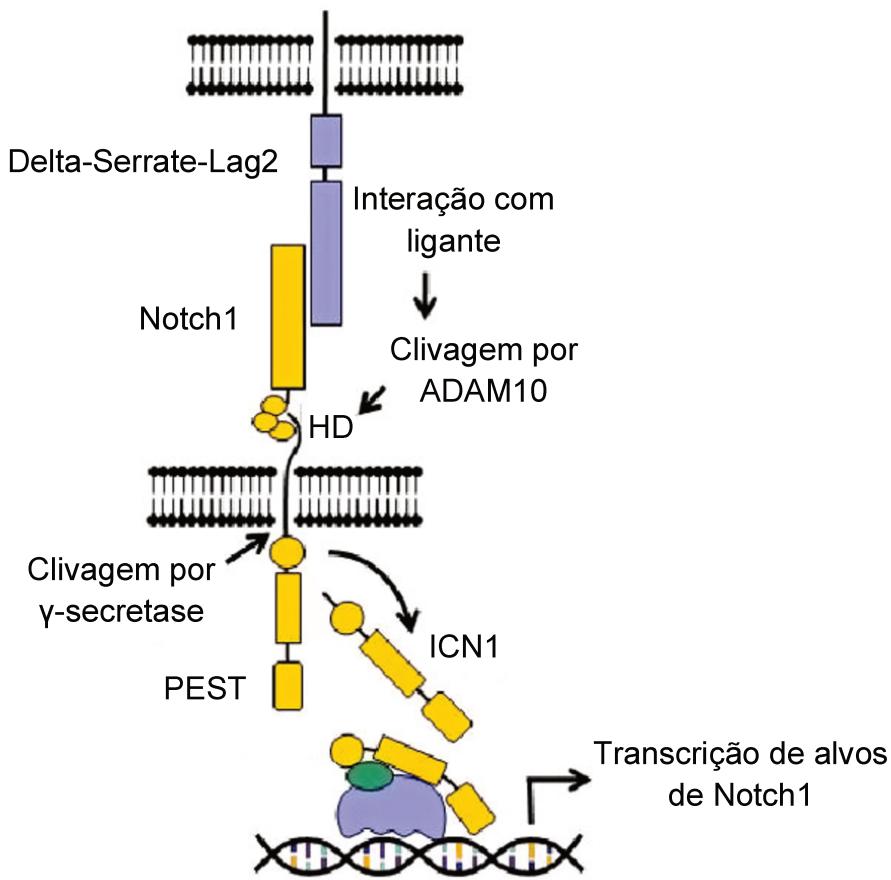
### 1.3 Leucemia linfoide aguda T-derivada

Dos casos de LLA, aproximadamente 15% correspondem a casos de LLA T-derivada (LLA-T). Em comparação à LLA B-derivada (LLA-B), a LLA-T é definida por características clínicas e biológicas distintas, muitas vezes associadas à um prognóstico desfavorável, como alta contagem leucocitária ao diagnóstico e envolvimento do SNC.<sup>32</sup> O uso de quimioterapia intensiva e estratificação dos pacientes segundo a resposta clínica nos protocolos de tratamento contemporâneos melhorou consideravelmente o prognóstico dos pacientes de LLA-T, de maneira a se atingir taxas de sobrevida livre de eventos similares àquelas observadas para pacientes de LLA-B.<sup>33,34</sup> No entanto, esta melhora nas taxas de cura foi acompanhada por efeitos adversos significativos a curto e longo prazos.<sup>35</sup>

A LLA-T é o resultado da transformação maligna de timócitos em estágios definidos da diferenciação de células T no timo.<sup>32</sup> Entre os eventos oncogênicos observados na LLA-T, podem ser citadas translocações cromossômicas que justapõem promotores e *enhancers* de genes de receptores de células T (TCR) com fatores de transcrição, como *T-cell acute lymphocytic leukaemia 1* (*TAL1*), *lymphoblastic leukaemia-derived sequence 1* (*LYL1*) e *homeobox-11* (*HOX11/TLX1*).<sup>36</sup> Estas translocações podem ocorrer em função de rearranjos incorretos dos genes de TCR, levando a padrões de expressão aberrantes capazes de alterar mecanismos de controle do ciclo celular, proliferação e diferenciação.<sup>35</sup> Ainda, são comumente observadas deleções de supressores tumorais, como *inhibitors of CDK4* (*INK4/CDKN2A*), duplicação do oncogene *V-myb myeloblastosis viral oncogene homolog* (*MYB*), e translocações que geram proteínas de fusão com atividade oncogênica, como *SCL-interrupting locus* (*SIL*)-*TAL1* e proteínas fusionadas a *mixed-lineage leukaemia* (*MLL*).<sup>35</sup>

Mais de 50% dos casos de LLA-T possuem mutações ativadores de *NOTCH1*,<sup>37</sup> gene codificador de um receptor que regula o desenvolvimento normal das células T.<sup>38</sup> O receptor Notch1 é ativado em resposta à ligação de proteínas da família Delta-Serrate-Lag2 à sua porção extracelular, iniciando uma

cascata de clivagens proteolíticas do receptor (Figura 1). A clivagem pela enzima  $\gamma$ -secretase resulta em liberação de Notch1 intracelular (ICN1), que é translocado para o núcleo para transcricionalmente regular múltiplos alvos, incluindo o oncogene *MYC*.<sup>39,40</sup> Em pacientes de LLA-T, são observadas mutações *missense* no domínio de heterodimerização do receptor (HD) ou pequenas inserções/deleções que resultam na perda parcial ou completa do domínio enriquecido em prolina, glutamato, serina e treonina (domínio PEST) do receptor.<sup>37</sup> O domínio de heterodimerização é necessário para a associação estável entre as porções extra- e intracelular do receptor Notch1, prevenindo sinalização independente de ligante. Mutações no domínio de heterodimerização facilitam um dos passos de clivagem, induzindo a liberação de ICN1.<sup>41</sup> O domínio PEST foi associado à regulação da meia-vida de ICN1,<sup>42</sup> de forma que mutações neste domínio acarretam em maior estabilidade e aumento da meia-vida de ICN1 no núcleo. Mutações ativadoras de *NOTCH1* são suficientes para induzir LLA-T em modelos animais, indicando um papel de Notch1 na transformação leucêmica.<sup>38</sup> Desta maneira, a inibição da via através do uso de inibidores da enzima  $\gamma$ -secretase (GSIs), necessária para a ativação dos receptores mutantes, se apresenta como uma atrativa abordagem terapêutica para tratamento da LLA-T.<sup>7,37</sup> No entanto, estudos em modelos animais mostraram que inibição sistêmica de sinalização por Notch1 resultou em toxicidade devido a acúmulo de células caliciformes no intestino.<sup>43,44</sup> Em concordância com estes resultados, um estudo clínico de fase 1 analisando os efeitos de um GSI em pacientes com recaída ou LLA-T refratária relatou toxicidade gastrointestinal.<sup>45</sup>



**Figura 1. A via de sinalização Notch1.** Intereração do receptor Notch1 com ligantes da família Delta-Serrate-Lag2 expressos na superfície de células vizinhas ativa a clivagem do receptor pela metaloprotease ADAM10 e subsequentemente pelo complexo  $\gamma$ -secretase, levando à liberação do domínio intracelular de Notch1 (ICN1). ICN1 é translocado para o núcleo, onde induz o recrutamento da maquinaria de transcrição para ativação de alvos transcricionais de Notch1.<sup>46</sup>

#### 1.4 Via de sinalização PI3K

Em trabalho publicado pelo nosso grupo no *Journal of Clinical Investigation*, demonstramos que a grande maioria dos casos de LLA-T apresenta hiperativação da via PI3K<sup>47</sup>. A enzima *phosphatidyl inositol 3-kinase* (PI3K) é um dos principais componentes da via de sinalização PI3K/*protein kinase B* (Akt)/*mammalian target of rapamycin* (mTOR), de cuja ativação depende uma ampla variedade de processos celulares, incluindo crescimento, diferenciação, ciclo celular, morte e sobrevivência.<sup>48,49</sup>

PI3K existe na forma de um heterodímero entre uma subunidade regulatória p85 e uma subunidade catalítica p110, representando uma família multigênica que pode ser dividida nas classes I, II e III.<sup>50</sup> A PI3K classe I está localizada no citoplasma e tem um importante papel em diversas vias de sinalização intracelular, principalmente em vias relacionadas com fatores de crescimento.<sup>51</sup> A classe IA inclui três subunidades catalíticas (p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  e p110 $\delta$ ), sendo ativada por receptores tirosina quinase e Ras. A classe IB inclui a subunidade p110 $\gamma$  e é ativada por receptores transmembrana acoplados à proteína G (GPCRs). PI3K $\gamma$  e  $\delta$  são restritas ao sistema hematopoético<sup>52</sup> e suas atividades em combinação contribuem para a geração e função das células T maduras.<sup>53-55</sup> A subunidade p110 ativada promove a fosforilação de lipídeos da membrana citoplasmática, levando à formação do potente segundo mensageiro *phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate* (PIP<sub>3</sub>). PIP<sub>3</sub> funciona como uma âncora para a ligação de proteínas que contêm um *pleckstrin homology domain*, acarretando na formação de complexos de sinalização que levam à ativação de uma ampla gama de moléculas efetoras, incluindo Akt<sup>56</sup> e mTOR.<sup>57</sup> A via PI3K é negativamente regulada por *phosphatase and tensin homologue* (PTEN), um reconhecido supressor tumoral. PTEN age através da desfosforilação de PIP<sub>3</sub>, impedindo a ativação de efetores da via.

Akt é uma proteína quinase capaz de transduzir sinais anti-apoptóticos ao fosforilar proteínas alvos envolvidas no crescimento celular e apoptose. A superexpressão de Akt induz transformação maligna e quimioresistência<sup>58</sup> através da fosforilação de enzimas chave na regulação da cascata de apoptose.<sup>28</sup>

Ativação constitutiva da via PI3K em cânceres hematológicos é capaz de suportar a proliferação tumoral, viabilidade e resistência a drogas *in vitro*.<sup>59-61</sup> A via PI3K foi identificada como associada à resistência à quimioterapia em diversos tipos de câncer, como adenocarcinoma pancreático, carcinoma cervical e cânceres de esôfago, próstata e ovário.<sup>62</sup> Na LLA-T, a ativação de mTOR foi indicada como associada à resistência a glucocorticoides,<sup>63</sup> uma característica comum em amostras de pacientes que sofreram recaída da doença.<sup>64</sup>

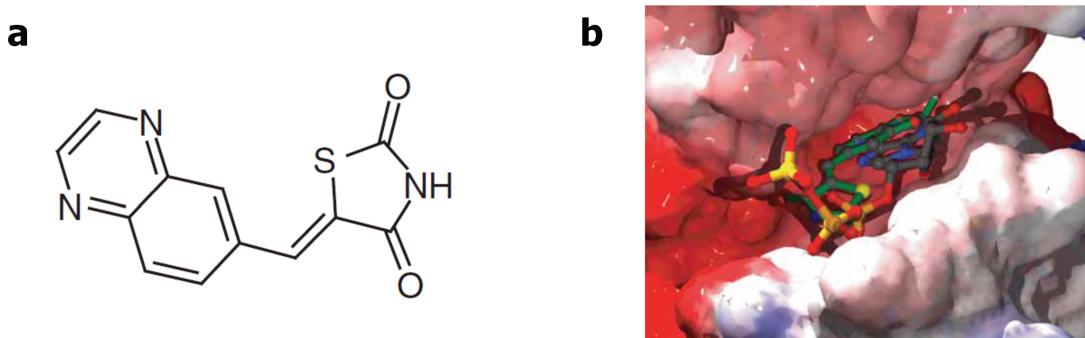
A hiperativação da via PI3K na LLA-T pode ocorrer em decorrência de múltiplos mecanismos, como estímulo do microambiente da medula óssea,<sup>65</sup> mutações oncogênicas no *interleukin-7 receptor (IL7R)* e regulação negativa de PTEN. A fosfatase PTEN, o principal regulador negativo da via PI3K, pode ser inativado por diversos mecanismos, incluindo mutações de perda de função e deleções, regulação transcricional negativa em pacientes com mutações ativadoras em *NOTCH1*,<sup>66,67</sup> regulação negativa dependente de miRNAs<sup>68</sup> e inativação pós-traducional através de fosforilação por *casein kinase 2 (CK2)* e oxidação por espécies reativas de oxigênio.<sup>47</sup> Pacientes de LLA-T com mutações em *PTEN* apresentam risco elevado de falha na terapia de indução e recaída.<sup>69,70</sup> Ainda, há evidência de que pacientes com mutações bialélicas de PTEN possuem menor taxa de sobrevida do que pacientes com mutações monoalélicas,<sup>70</sup> sugerindo que o nível de ativação da via PI3K possa influenciar a resistência ao tratamento.

## 1.5 Inibição de PI3K

A via PI3K, sendo uma das principais vias relacionadas à sobrevivência celular, representa um potencial alvo terapêutico no tratamento das leucemias. No entanto, inibidores clássicos de PI3K, como wortmannin e LY294002, apresentam forte toxicidade e baixas solubilidade e estabilidade.<sup>71,72</sup>

Em nosso laboratório, temos trabalhado com o AS605240, que através da interação com a cavidade de ligação ao ATP da subunidade p110, se caracteriza como um potente inibidor competitivo da atividade enzimática de PI3K (Figura 2).<sup>73</sup> A droga apresenta características farmacológicas favoráveis, como alta permeabilidade celular, boa biodisponibilidade e pode ser utilizado *in vivo* durante meses por administração oral ou intraperitoneal.<sup>73,74</sup> O uso de AS605240 foi inicialmente dirigido ao tratamento de artrite reumatóide e lúpus eritematoso, dada sua capacidade de inibição de neutrófilos e linfócitos CD4<sup>+</sup>.<sup>73,74</sup> Através de colaboração com o laboratório do Dr. Rosendo A. Yunes (Departamento de

Química da Universidade Federal de Santa Catarina) sintetizamos a droga em quantidades suficientes para a realização de estudos *in vitro* e em modelo de LLA-T xenográfico em camundongos NOD/SCID (NOD.CB17-Prkdcscid/J).



**Figura 2. Inibidor de PI3K AS605240.** (a) Estrutura química do composto AS605240. (b) Superfície molecular da cavidade de ligação ao ATP da PI3Ky, na qual estão representadas as moléculas de ATP (vermelho/amarelo) e de AS605240 (verde).<sup>73</sup>

## 2. OBJETIVOS

A via da PI3K pode ser hiperativada na LLA-T em função de múltiplas anormalidades genéticas e epigenéticas.<sup>47,65–68</sup> Sendo assim, a atividade da via muito provavelmente se comporta como uma variável contínua submetida ao efeito combinatório de vários eventos. A atual carência de ensaios quantitativos para acessar os níveis de ativação da via em amostras primárias de pacientes dificulta o desenho de estudos que visam identificar o real impacto da ativação da via na clínica da LLA-T. Sob a perspectiva de que o nível de ativação da via PI3K potencialmente influencia a resistência ao tratamento na LLA-T,<sup>69,70</sup> identificar biomarcadores para a atividade da via é de extrema importância.

Primeiramente, procuramos obter uma assinatura gênica de atividade da via PI3K em células de LLA-T. Para tal, tratamos 7 linhagens celulares e células primárias de LLA-T provenientes de 15 pacientes com inibidor de PI3K AS605240 ou veículo por 6h. Estas células foram então submetidas a análise de microarranjos de expressão Affymetrix. As assinaturas gênicas de atividade da via obtidas em linhagens e células primárias foram então comparadas com dados previamente publicados que associaram perfis de expressão gênica com diversas condições experimentais ou biológicas e com fenótipos associadas à resistência ou sensibilidade à quimioterapia em LLA. Estas análises foram realizadas através de *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA), *Connectivity Map Analysis* (CMap) e *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA).

Em seguida, utilizamos as assinaturas gênicas de PI3K para classificar 24 amostras ao diagnóstico de pacientes de LLA-T tratados segundo protocolo GBTLI LLA-99,<sup>75</sup> através de um score de atividade da via PI3K baseado nos perfis de expressão gênica global destas amostras. A atividade da via PI3K pode, então, ser comparada com características clínicas e biológicas dos pacientes.

Os dados de expressão gênica acabaram em nos fornecer indícios de que a via PI3K está potencialmente associada à resistência à quimioterapia na LLA-T. Sendo assim, procuramos avaliar os efeitos do inibidor de PI3K AS605240 no tratamento de

linhagens e celulas primárias de LLA-T, no que diz respeito à indução de morte celular por apoptose, especificidade do efeito citotóxico, tamanho celular e sensibilização à quimioterápicos comumente utilizados no tratamento de LLA.

Por fim, avaliamos o efeito do uso de AS605240 em modelo xenográfico de LLA-T primária em camundongos NOD/SCID. Este modelo foi utilizado para a análise da taxa da progressão leucêmica em camundongos tratados ou não com AS605240 e na análise de sinergismo entre AS605240 e o glucocorticoide dexametasona. Nossos dados, desta maneira, procuraram obter informação a respeito do papel da via PI3K na resistência à quimioterapia na LLA-T e o potencial para uso clínico de inibidoresd e PI3K.

### **3. RESULTADOS**

## **CAPÍTULO I: ARTIGO SUBMETIDO PARA A REVISTA LEUKEMIA**

**PI3K inhibition synergizes with glucocorticoids but antagonizes with methotrexate in T-cell acute lymphoblastic leukemia**

André Bortolini Silveira<sup>1</sup>, Angelo Brunelli Albertoni Laranjeira<sup>1</sup>, Paulo Leal<sup>2</sup>, Bruno António Cardoso<sup>3</sup>, João Taborda Barata<sup>3</sup>, Rosendo Augusto Yunes<sup>2</sup>, Nilson Ivo Tonin Zanchin<sup>4</sup>, Sílvia Regina Brandalise<sup>1</sup>, José Andrés Yunes<sup>1,5,\*</sup>

1. Centro Infantil Boldrini, Campinas, SP, Brazil. 2. Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil. 3. Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal. 4. Instituto Carlos Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Curitiba, PR, Brazil. 5. Departamento de Genética Médica, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil.

**\*Corresponding author:** José Andrés Yunes; Centro Infantil Boldrini, Laboratório de Biologia Molecular, 13083-210, Campinas, SP, Brazil; Tel.: +55 19 37875070; Fax: +55 19 32893571; E-mail address: andres@boldrini.org.br

**Running title:** PI3K inhibition sensitizes T-ALL to chemotherapy

This work was supported by grants from FAPESP (08/10034-1) to JAY. ABS and ABAL were supported by CNPq and FAPESP fellowships, respectively.

The authors declare no conflict of interest.

### 3.1 ABSTRACT

The PI3K pathway is frequently hyperactivated in primary T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) cells. Activation of the PI3K pathway has been suggested as one mechanism of glucocorticoid resistance in T-ALL, and patients harboring mutations in the PI3K negative regulator *PTEN* may be at increased risk of induction failure and relapse. In this study, a PI3K gene expression signature was used as readout of PI3K activity in diagnostic T-ALL samples. We identified Myc as an important downstream integrator of PI3K pathway activity in T-ALL and found that higher PI3K activity is associated with glucocorticoid resistance and worse clinical outcome. The PI3K inhibitor AS605240 showed anti-leukemic activity and strong synergism with glucocorticoids both *in vitro* and in a NOD/SCID xenograft model of T-ALL. In contrast, PI3K inhibition showed antagonism with methotrexate and daunorubicin, drugs that preferentially target dividing cells. This antagonistic interaction, however, could be circumvented by the use of correct drug scheduling schemes. Our data indicate the potential benefits and difficulties for the incorporation of PI3K inhibitors in T-ALL therapy.

**Keywords:** PI3K, AS605240, T-Cell Leukemia, Drug Resistance, Glucocorticoids, Methotrexate.

## 3.2 INTRODUCTION

T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) is an aggressive hematologic cancer.<sup>5</sup> The prognosis of children with T-ALL has improved with modern treatment protocols, based on the use of aggressive multi-agent therapies.<sup>11</sup> However, T-ALL patients displaying chemotherapy resistance show very poor survival. Accumulating evidence indicates that the PI3K pathway is linked to resistance to therapy in several types of cancer.<sup>62</sup>

Class I PI3Ks are a family of lipid kinases predominantly activated by protein tyrosine kinases in response to cell surface receptors. PI3K phosphorylates phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) generating phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PIP<sub>3</sub>). PIP<sub>3</sub> serves as an anchor for pleckstrin homology (PH) domain-containing proteins which initiate the assembly of signaling complexes that results in the activation of a plethora of downstream effector molecules, including protein kinase B (Akt)<sup>56</sup> and the mammalian target of rapamycin (mTOR).<sup>57</sup> The PI3K pathway is central to the control of cell survival, energy metabolism, cellular motility and cell cycle progression.<sup>48,49</sup>

Constitutive activation of the PI3K pathway in hematological malignancies has been shown to support tumor cell proliferation, viability and drug resistance *in vitro*.<sup>59–61</sup> Moreover, PI3K signaling pathway is frequently hyperactivated in primary T-ALL cells, for instance due to microenvironmental stimulation,<sup>65</sup> interleukin-7 receptor (*IL7R*) oncogenic mutations or phosphatase and tensin homolog (*PTEN*) inactivation.<sup>47,68,69,76</sup> Activation of the PI3K effector mTOR in T-ALL has been suggested to represent one mechanism of resistance to glucocorticoids,<sup>63</sup> a common feature of relapse.<sup>64</sup> Moreover, we and others have shown that T-ALL patients harboring *PTEN* mutations may be at increased risk of induction failure and relapse.<sup>69,70</sup> Importantly, patients harboring biallelic *PTEN* mutations had inferior survival than those harboring monoallelic mutations,<sup>70</sup> suggesting that the level of PI3K activation may influence resistance to treatment. The PI3K activity most likely behaves as a continuous variable subjected to the combined effects of

many different genetic and epigenetic abnormalities. The current lack of reliable quantitative assays to measure PI3K activation levels in patient samples has hampered studies on the impact of PI3K in the clinics. Identifying reliable biomarkers that serve as readout of PI3K activation is therefore of paramount importance.

In this study, T-ALL cells were treated with the PI3K inhibitor AS605240 to identify a transcriptional PI3K signature used to infer PI3K activity levels in diagnostic T-ALL samples and their relation to chemotherapy resistance. The favorable pharmacological and biochemical characteristics of AS605240 allowed us to test the long term inhibition effects of PI3K in a xenograft model of T-ALL in NOD/SCID mice. Functional assays demonstrated that PI3K inhibition sensitizes T-ALL cells to glucocorticoids but antagonizes methotrexate (MTX) and daunorubicin (DNR), unless correct drug scheduling is used.

### **3.3 METHODS**

#### **3.3.1 Synthesis of AS605240**

The water-soluble potassium salt of AS605240 was synthesized according to patent WO 2004007491. Identity and purity were confirmed by mass spectrometry and nuclear magnetic resonance.

#### **3.3.2 Primary T-ALL cells**

Bone marrow mononuclear cells were obtained from patients with newly diagnosed T-ALL accrued from 2000 to 2007 at Centro Infantil Boldrini. Treatment was performed according to the Brazilian GBTLI ALL-99 protocol.<sup>75</sup> *NOTCH1*, *PTEN* and *IL7R* were sequenced as described elsewhere.<sup>67,70,76</sup> The study was approved by the FCM/UNICAMP Research Ethics Committee (CAAE:

0014.0.144.146-08; Anexos 1-2) and informed consent was obtained from parents.

### **3.3.3 Cell lines culture and survival assays**

Cell lines were cultured in RPMI-1640 medium, 10% fetal bovine serum (FBS), and penicillin/streptomycin at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Medium was changed 12-24h before all experiments. To measure IC<sub>50</sub> and Combination Index (CI) values, cells (2-6x10<sup>4</sup>) were incubated for 48-96h with increasing concentrations of AS605240, prednisolone, L-asparaginase, MTX and/or DNR and cell viability was measured by the MTT assay. IC<sub>50</sub> and CI values were calculated with the GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) and CalcuSyn (Biosoft, Cambridge, UK)<sup>77</sup> softwares, respectively.

### **3.3.4 PI3K gene expression signatures**

Cell lines (5-10x10<sup>7</sup>) were cultured with the AS605240 IC<sub>50</sub> value or vehicle for 6h, RNA was extracted by the phenol-chloroform method and purified with the RNAeasy Mini Kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA, USA). Samples were processed with the One-Cycle Target Labeling and Control Reagents Kit (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) and hybridized on HG-U133 Plus 2.0 Arrays (Affymetrix). Cryopreserved primary T-ALL cells were thawed, washed in RPMI-1640 twice and viable cells were isolated with the Dead Cell Removal Kit (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany). Approximately 3x10<sup>6</sup> cells were cultured with 20 µM of AS605240 or vehicle for 6h in AIM-V medium (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 2 mM glutamine, 10% FBS, and penicillin/streptomycin at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. RNA was extracted with the Illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare, Little Chalfont, UK), processed with the GeneChip WT cDNA Synthesis and Amplification Kit (Affymetrix) and hybridized on Human Gene 1.0 ST Arrays (Affymetrix). Paired Limma analysis (<http://www.bioconductor.org/packages/2.12/bioc/html/limma.html>) was used to obtain differentially expressed genes with adjusted p-value<0.05 and Fold-

change>1.5. GSEA analyses (<http://www.broadinstitute.org/gsea/>)<sup>78</sup> were performed with 1000 phenotype permutations and default settings. Only probesets/transcript clusters annotated with a Gene Symbol were used in the analyses. For Connectivity Map analysis (<http://www.broadinstitute.org/cmap/>),<sup>79</sup> only probesets identical in HG-U133A and HG-U133 Plus 2.0 arrays were used. Ingenuity Pathways Analysis (Ingenuity Systems, Redwood City, CA, USA) was performed with the Gene Symbols of AS605240 responsive genes. Principal Component Analysis was performed with the MultiExperiment Viewer (<http://www.tm4.org/mev.html>).

### **3.3.5 Gene expression of diagnostic T-ALL**

Total RNA was extracted from T-ALL lysates preserved in guanidine isothiocyanate solution, using the Illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare). RNA samples were processed with the WT Expression Kit (Ambion, Austin, TX, USA) and GeneChip WT Terminal Labeling and Controls Kit (Affymetrix), and hybridized on Human Gene 1.0 ST Arrays. Expression values were obtained with iterPLIER as above. GSEA analyses were performed with 1000 geneset permutations. Ingenuity Pathways Analysis was performed as above. AS605240-responsive genes in cell lines and primary T-ALL cells were combined to calculate a PI3K activity score. The score consisted on the sum of log-scale expression values multiplied by the respective -logFC. Higher scores would indicate higher PI3K activity. *IL7R* signature genes<sup>76</sup> were used to calculate a similar score. Higher scores would indicate a gene expression signature more characteristic of IL7R mutants T-ALL.

### **3.3.6 Cell signaling assays**

PIP<sub>3</sub> quantification of Jurkat cells (3x10<sup>7</sup>) treated for 8h with 20 µM AS605240 or vehicle was performed in duplicates using the K-2500 PIP<sub>3</sub> Mass

ELISA Kit (Echelon Biosciences, Salt Lake City, UT, USA). p-Akt quantification of Jurkat cells treated for 24h with increasing concentrations of AS605240 or vehicle was performed using the Akt[pS473] ELISA Kit (Invitrogen). Western blotting analysis of cells treated with AS605240 IC<sub>50</sub> values or vehicle were performed using antibodies against Akt (#4691, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), p-Akt (#4060, Cell Signaling Technology), Myc (N-262, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and β-actin (IM-0075, Rhea Biotech, Campinas, Brazil).

### **3.3.7 Cell size analysis**

Jurkat or Molt-4 cells treated for 24h with AS605240 IC<sub>50</sub> values or vehicle were incubated with propidium iodide (PI) 5 µg/mL at 37°C for 15 minutes to label necrotic cells. Size of live cells was analyzed in a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

### **3.3.8 Apoptosis analysis**

Jurkat cells (1x10<sup>6</sup>) treated for 8h with AS605240 IC<sub>50</sub> value or vehicle and primary cells (1.5x10<sup>6</sup>) collected from one T-ALL patient treated for 6h with 20 µM of AS605240 or vehicle were washed with PBS, resuspended in 100 µL of Annexin-V binding buffer, incubated at 37°C for 15 minutes with FITC-conjugated Annexin-V (Invitrogen Corporation) and PI 5 µg/mL and analyzed in a FACSCalibur flow cytometer.

### **3.3.9 Cell cycle and Brdu incorporation assays**

For cell cycle analyses, Molt-4 cells (2x10<sup>5</sup>) were treated with the IC<sub>50</sub> values of AS605240, MTX and/or vehicle for 24h. Cells were fixed in 70% ethanol, washed with PBS and incubated at 37°C for 15 min in 1 mL PI Buffer (0.1% Triton

X-100, 0.2 mg/mL RNase, and 20 µg/mL PI, in PBS). Ten thousand events were collected in a FACSCalibur flow cytometer and data was analyzed with the ModFit LT 3.3 software (Verity Software House, Topsham, ME, USA). For BrdU incorporation assays, Molt-4, P12-ICHIKAWA and Jurkat cells ( $1\times 10^6$ ) were treated for 24h with AS605240 IC<sub>50</sub> values or vehicle, pulsed for 30 min with 10 µM BrdU and processed with the BrdU Flow Citometry Assay Kit (Becton Dickinson). Events ( $2\times 10^4$ ) were analyzed in a FACSCanto flow cytometer (Becton Dickinson).

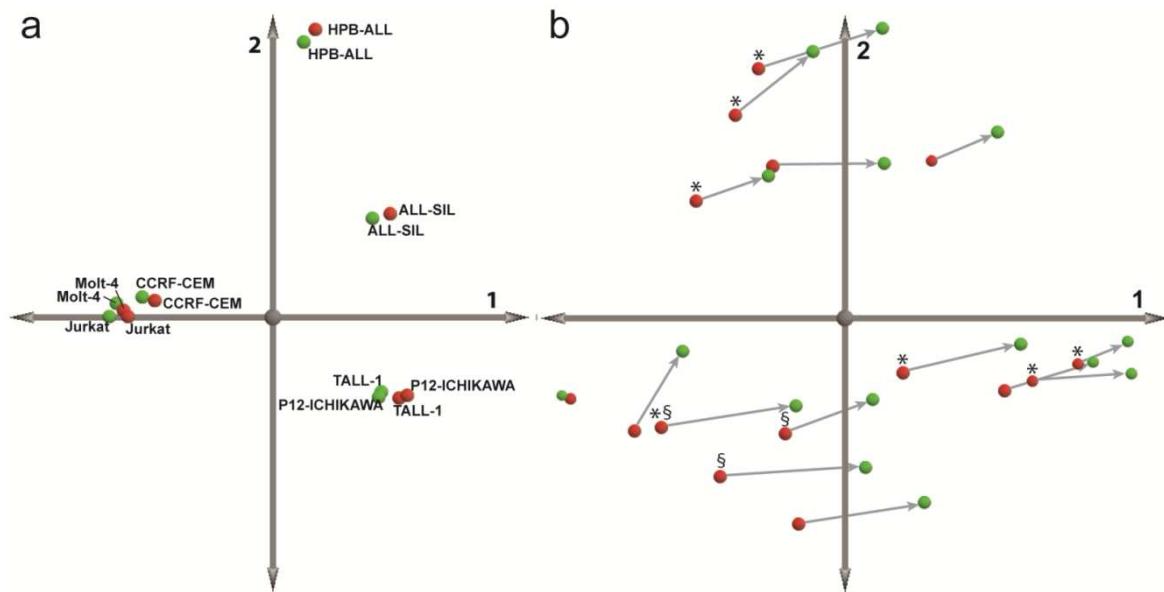
### **3.3.10 *In vivo* experiments**

Primary T-ALL cells were thawed, washed with PBS and  $1\times 10^7$  cells were injected in NOD/SCID (NOD.CB17-Prkdc<sub>scid</sub>/J) mice (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) via the tail vein. After 10-12 weeks, successfully engrafted mice were sacrificed, T-ALL cells were collected from spleen and liver and  $1\times 10^7$  cells were immediately injected in higher number of non-irradiated mice for the following experiments. For disease progression experiments, mice received 20 mg/Kg of AS605240 (n=5) or vehicle (n=12), intraperitoneally, twice a day, 5 days a week, starting on the eleventh day after injection of leukemia cells. Number of human CD45+ cells in the peripheral blood was regularly measured after red blood cells lysis, by flow cytometry, and exponential growth curves were compared with the F test of the best-fit K values. For survival analysis experiments, mice were randomly distributed into the different treatment groups (5 animals per group) when human CD45+ reached  $\geq 0.5\%$  of peripheral blood cells in half of the animals. Mice were treated with 30 mg/Kg of AS605240 and/or 5 mg/Kg of dexamethasone, intraperitoneally, once a day, 5 days a week, for 35 days. Kaplan-Meier survival curves were compared using the log-rank test with the GraphPad Prism 5 software. The study was approved by the CEEA/UNICAMP Animal Experimentation Ethics Committee (Protocol 1766-1; Anexo 3).

## 3.4 RESULTS

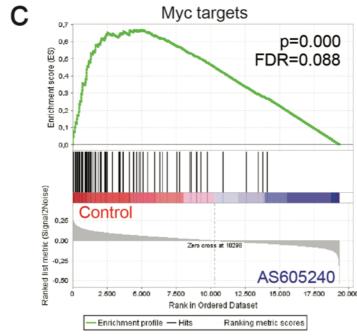
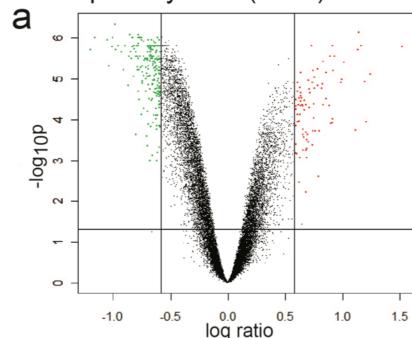
### 3.4.1 PI3K activity is associated with increased chemotherapy resistance and poor prognosis in T-ALL

Most cell lines are maintained in culture for years and accumulate several genetic lesions not characteristic of primary disease.<sup>80</sup> On the other hand, ALL primary cells do not divide *in vitro*,<sup>81</sup> which may affect their response to small molecules.<sup>82</sup> Hence, we decided to obtain transcriptional signatures of PI3K activity from both cell lines and primary cells, which would provide complementary aspects of gene expression modulation by PI3K. To do so, seven T-ALL cell lines and fifteen diagnostic T-ALL patient samples were treated with the PI3K inhibitor AS605240 or vehicle for 6h, and subjected to global gene expression analysis using Affymetrix arrays. Principal Component Analysis (PCA) showed that most samples responded similarly to PI3K inhibition, irrespectively of *PTEN* and *NOTCH1* mutational status (Supplementary Figure 1). Using paired Limma analysis, we obtained 211 genes downregulated and 78 genes upregulated in T-ALL primary cells (adjusted p-value<0.05, FC>1.5; Figure 1a; Supplementary Table 1 [Anexo 4]) and 174 genes downregulated and 395 genes upregulated in T-ALL cell lines (adjusted p-value<0.05, FC>1.5; Figure 1b; Supplementary Table 2 [Anexo 5]) in response to AS605240 treatment. As expected, Connectivity Map analysis showed that the signature resulting from PI3K inhibition in T-ALL cell lines correlated with signatures of the mTOR inhibitor rapamycin (sirolimus) and the classical PI3K inhibitors wortmannin and LY-294002 (Supplementary Figure 2). Although other interpretations may be possible, genes downregulated by AS605240 were here considered to be under positive transcriptional control of PI3K, whereas those upregulated by AS605240 were considered under negative control of PI3K.

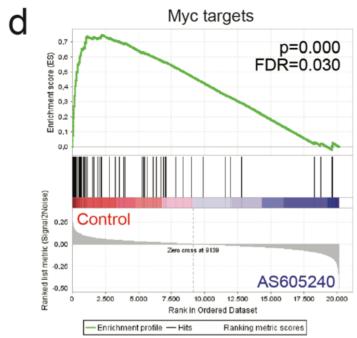
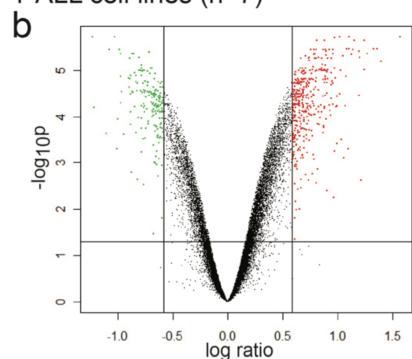


**Supplementary Figure 1. T-ALL samples responded similarly to PI3K inhibition, irrespectively of *PTEN* and *NOTCH1* mutational status.** Principal component analysis of global gene expression data of T-ALL cell lines (a) and primary cells (b) treated for 6h with AS605240 (in red) or vehicle (in green). Most samples responded similarly to AS605240 treatment, evidenced by a shift in the same direction of treated samples in comparison to controls (arrows). *NOTCH1* (\*) and *PTEN* mutated patients (§) are indicated for control samples only. Gene expression profile was obtained with HG-U133 Plus 2.0 arrays for T-ALL cell lines and Human Gene 1.0 ST Arrays for T-ALL primary cells.

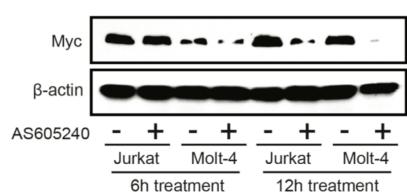
T-ALL primary cells (n=15)



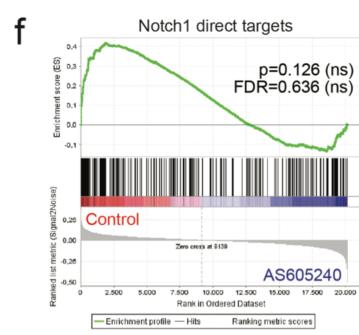
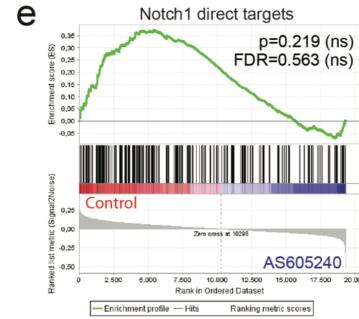
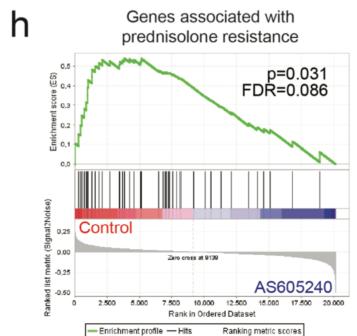
T-ALL cell lines (n=7)



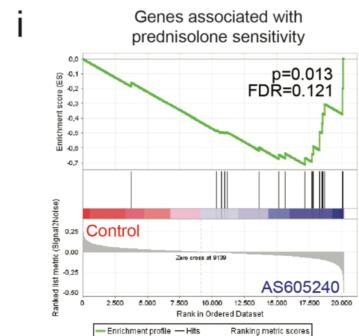
**g**



**h**



**i**

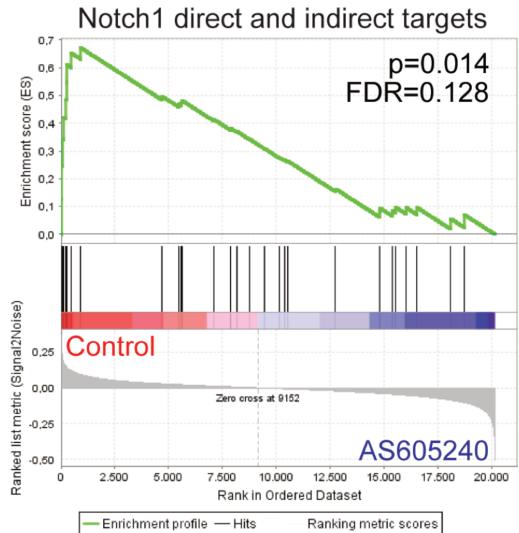


**Figure 1. PI3K inhibition downregulates Myc in a Notch1-independent manner and is associated to glucocorticoid sensitivity.** (a-b) Volcano plots representing downregulated (green) and upregulated (red) genes of paired Limma analysis comparing global gene expression data of T-ALL cells treated with vehicle vs. AS605240 for 6h. Vertical lines indicate adjusted p-values<0.05 and horizontal lines indicate FC>1.5. (c-d) GSEA enrichment plots. Targets of Myc<sup>83-85</sup> are downregulated in T-ALL cell lines and primary cells upon treatment with the PI3K inhibitor AS605240 for 6h (p<0.05 and FDR<0.25). We show representative plots corresponding to the gene set described in Schuhmacher et al., 2001. (e-f) In contrast, direct targets of Notch1<sup>32</sup> were not significantly modulated by AS605240. (g) AS605240 inhibits accumulation of Myc protein. Western blotting of Myc and  $\beta$ -actin of Jurkat and Molt-4 cells treated with the IC<sub>50</sub> values of AS605240 or vehicle for 6h and 12h. (h, i) Genes discriminative for prednisolone resistance<sup>34</sup> were downregulated in AS605240-treated cell lines and genes discriminative for prednisolone sensitivity<sup>34</sup> were upregulated in AS605240-treated ones.

Drug	Score	p-value	CMap plot
wortmannin	0.807	0.000	
LY-294002	0.766	0.000	
sirolimus	0.843	0.000	

**Supplementary Figure 2. AS605240-derived gene expression signature correlated with signatures of other PI3K pathway inhibitors.** Connectivity Map analysis using AS605240 responsive genes in T-ALL cell lines. AS605240 modulated gene expression similarly to two classical PI3K inhibitors (wortmannin and LY-294002) and the mTOR inhibitor rapamycin (sirolimus).

GSEA analysis showed that AS605240 treatment downregulated several gene sets related to cellular growth in both T-ALL cell lines and primary cells, including energy metabolism (glucose transport and metabolism, oxidative phosphorylation, pyruvate metabolism, and TCA cycle), transcription (nucleotide metabolism, RNA polymerase III transcription, tRNA and miRNA biosynthesis) and biosynthesis of a plethora of compounds and cellular structures (biosynthesis of purines, pyrimidines, amino acids, glucose, fatty acids and steroids, and biogenesis of lysosome vesicles and mitochondria). Among the top tier of gene sets transcriptionally downregulated by AS605240 in both cell lines and primary cells, several represented targets of Myc<sup>83–85</sup> (Figures 1c-d), a master regulator of cell growth and multiple biosynthetic and metabolic pathways,<sup>86</sup> whose expression correlates with leukemia initiating activity in T-ALL.<sup>87</sup> Myc inhibition by AS605240 appeared to be Notch1-independent, since Notch1 direct targets<sup>40</sup> were not modulated (Figure 1e-f). On the other hand, a broader gene set of Notch1-responsive genes, which includes several Myc targets,<sup>39</sup> was significantly downregulated in cell lines treated with AS605240 (Supplementary Figure 3). Although MYC mRNA levels were not significantly altered after 6h of AS605240 treatment (data not shown), western blotting analysis evidenced decreased Myc protein levels in Jurkat and Molt-4 cells after PI3K inhibition (Figure 1g). These results suggest that Myc serves as a convergence point between PI3K and Notch1 signaling modules.



**Supplementary Figure 3. AS605240 downregulated a gene set of Notch1-responsive genes, characterized by the presence of several Myc targets.** GSEA analysis indicating that Notch1-responsive genes<sup>39</sup> are downregulated in T-ALL cell lines treated with AS605240 for 6h ( $p<0.05$  and  $FDR<0.25$ ).

Ingenuity Pathway Analysis showed that the top biofunctions affected by AS605240 in both cell lines and primary cells were related to cholesterol biosynthesis (Supplementary Figure 4). Glucocorticoid resistance in T-ALL has been associated to the upregulation of genes linked to cellular respiration, biosynthetic and metabolic pathways, proliferation and Myc. Notably, genes responsible for cholesterol biosynthesis were found highly upregulated in prednisolone resistant T-ALL,<sup>88</sup> and ALL cells were shown to be particularly dependent on endogenously synthesized cholesterol, which is essential for the synthesis of cellular membranes of highly proliferative cells.<sup>89</sup> Because PI3K inhibition targeted genes involved in Myc signaling, cellular growth, and cholesterol biosynthesis, we hypothesized that the AS605240-derived signature would be correlated with gene expression patterns of glucocorticoid resistance in T-ALL. Indeed, GSEA analysis showed that genes associated with prednisolone resistance<sup>88</sup> were downregulated (Figure 1h), whereas those associated with prednisolone sensitivity<sup>88</sup> were upregulated (Figure 1i) in AS605240-treated cell lines.



**Supplementary Figure 4. AS605240 modulates the expression of genes related to cholesterol biosynthesis.** Ingenuity Pathway Analysis was performed with AS605240 responsive gene in (a) T-ALL cell lines and (b) primary T-ALL cells. Top biofunctions downregulated by AS605240 in both cell lines and primary cells represented cholesterol biosynthesis pathways.

The PI3K activity signatures were then compared against expression microarray data of 24 primary T-ALL samples obtained at diagnosis from patients treated under the GBTLI ALL-99 protocol<sup>75</sup> at Centro Infantil Boldrini, of which 23 were consecutive (for clinical and biological data, refer to Supplementary Table 3). Genes modulated by AS605240 in cell lines and primary cells were combined to calculate a score of PI3K activity in these patients, based on the sum of FC-

corrected log-scale measures of gene expression. This type of scoring was found useful in characterizing hepatocellular carcinoma by a gene expression signature associated to retinoblastoma (Rb) tumor suppressor loss.<sup>90</sup> We validated this scoring method by being able to show clustering of *IL7R* mutated patients when scores were calculated using the 81 signature genes associated to *IL7R* mutations in T-ALL<sup>76</sup> (Supplementary Table 4). Ranking of patients according to the PI3K score suggest clustering of induction failures (>5% leukemic blasts in bone marrow after 4 weeks of remission induction therapy) and relapses among patients presenting with gene expression patterns characteristic of higher PI3K activity (Figure 2a). Accordingly, GSEA analysis showed that genes under positive control of PI3K (downregulated by AS605240) had higher expression values in the patients that underwent induction failure or relapse (Figure 2b-c).

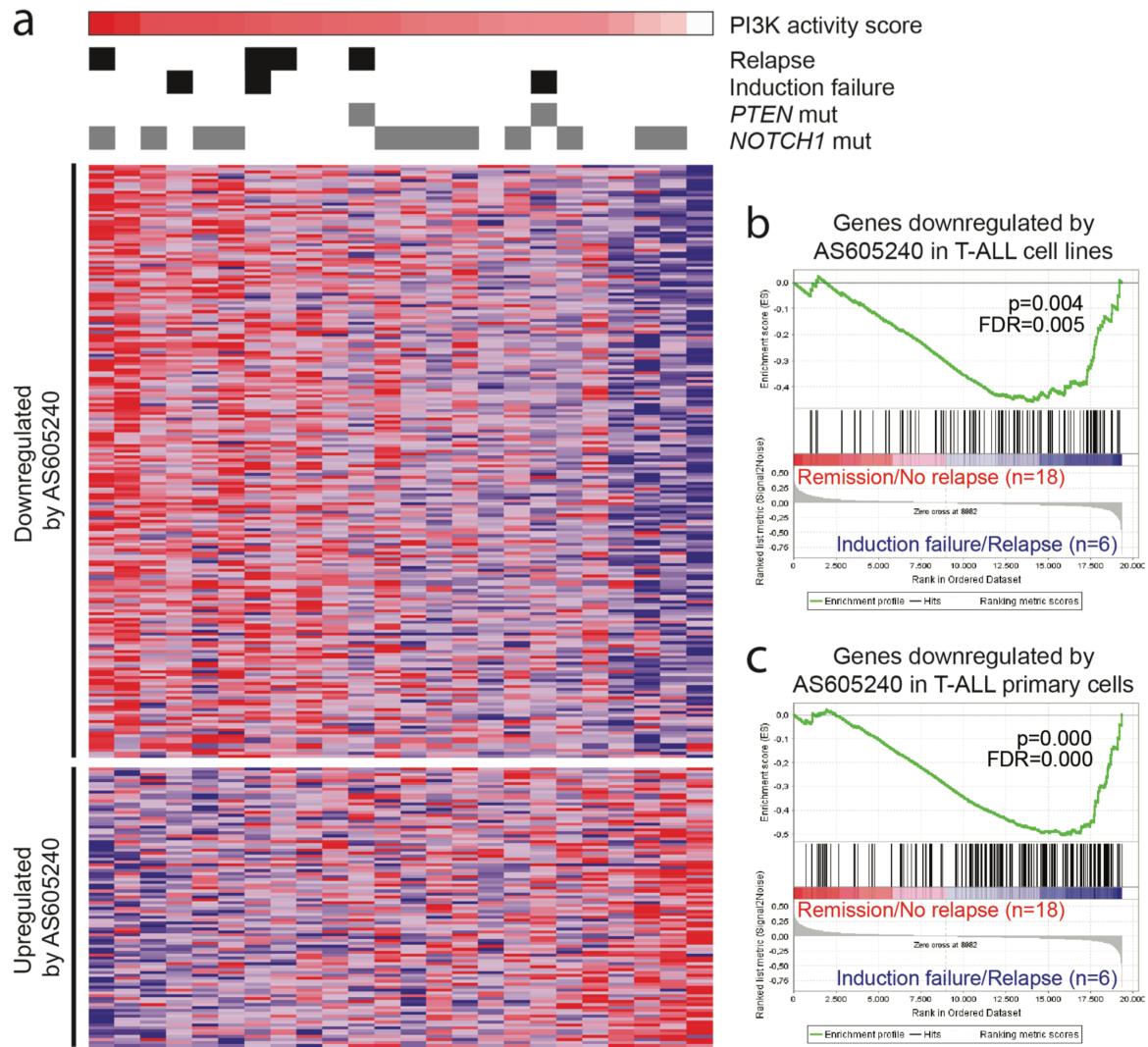
Altogether, these data suggest that higher PI3K activity is associated with increased chemotherapy resistance and poor prognosis, which is in accordance with previous data showing that PTEN mutated patients may be at increased risk of early treatment failure and relapse.<sup>69,70</sup>

**Supplementary Table 3.** Clinical and biological features of the 24 T-ALL cases included in expression microarray analysis. *NOTCH1*, *PTEN* and *IL7R* mutated (Mut) and wild-type (wt) samples are indicated.

Sample	<i>NOTCH1</i>	<i>PTEN</i>	<i>IL7R</i>	Age (years)	Gender	WBC (cells/mm <sup>3</sup> )	Induction Failure	Remission	Relapse	PI3K Score
228	Mut	wt	wt	10,89	Male	262 000	No	Yes	Yes	-7,3
974	wt	wt	wt	11,12	Male	265 000	No	Yes	No	-31,5
572	Mut	wt	wt	16,17	Male	648 000	No	Yes	No	-77,3
134	wt	wt	wt	3,35	Female	78 200	Yes	No	No	-78,0
704	Mut	wt	wt	13,45	Male	19 900	No	Yes	No	-78,5
370	Mut	wt	wt	3,51	Female	20 200	No	Yes	No	-82,3
932	wt	wt	wt	4,93	Male	599 000	Yes	Yes	Yes	-88,9
657	wt	wt	wt	15,56	Female	317 000	No	Yes	Yes	-97,4
906	wt	wt	wt	3,89	Male	83 200	No	Yes	No	-97,9
860	wt	wt	wt	12,04	Male	52 800	No	Yes	No	-104,6
595	wt	Mut	Mut	6,65	Male	368 000	No	Yes	Yes	-107,1
887	Mut	wt	wt	11,47	Male	417 000	No	Yes	No	-107,6
213	Mut	wt	wt	2,9	Female	980 000	No	Yes	No	-122,3
341	Mut	wt	wt	8,57	Male	57 000	No	Yes	No	-126,1
306	Mut	wt	wt	12,02	Female	21 900	No	Yes	No	-126,1
295	wt	wt	NA	8,69	Female	17 900	No	Yes	No	-136,5
436	Mut	wt	wt	6,83	Male	132 000	No	Yes	No	-142,5
783	wt	Mut	wt	14,85	Male	501 000	Yes	No	No	-142,8
529	Mut	wt	Mut	15,22	Male	66 700	No	Yes	No	-143,3
874	wt	wt	wt	1,71	Male	621 000	No	Yes	No	-144,7
1009	wt	wt	Mut	9,66	Male	66 900	No	Yes	No	-161,2
660	Mut	wt	wt	17,6	Male	522 000	No	Yes	No	-187,7
808	Mut	wt	Mut	7,92	Female	74 300	No	Yes	No	-202,7
768	wt	wt	wt	12,5	Male	159 000	No	Yes	No	-254,6

**Supplementary Table 4.** Ranking of diagnostic T-ALL samples according to the “IL7R mutated score” successfully clustered *IL7R* mutated samples. Mutated *IL7R* signature genes were used to calculate the score. The score was based on the sum of FC-corrected log-scale measures of each signature gene. Gene expression was measured with the Human Gene 1.0 ST arrays. *IL7R* mutated (Mut) and wild-type (wt) samples are indicated.

Sample	<i>IL7R</i> status	<i>IL7R</i> score
T-ALL_808	Mut	152.5
T-ALL_887	wt	143.3
T-ALL_595	Mut	137.5
T-ALL_1009	Mut	120.0
T-ALL_704	wt	104.7
T-ALL_932	wt	87.4
T-ALL_529	Mut	86.9
T-ALL_228	wt	79.3
T-ALL_341	wt	77.6
T-ALL_906	wt	66.2
T-ALL_436	wt	48.2
T-ALL_657	wt	47.5
T-ALL_572	wt	45.4
T-ALL_860	wt	41.9
T-ALL_134	wt	41.1
T-ALL_370	wt	35.2
T-ALL_660	wt	30.8
T-ALL_974	wt	30.6
T-ALL_213	wt	28.1
T-ALL_783	wt	22.8
T-ALL_306	wt	22.3
T-ALL_768	wt	21.9
T-ALL_874	wt	17.1

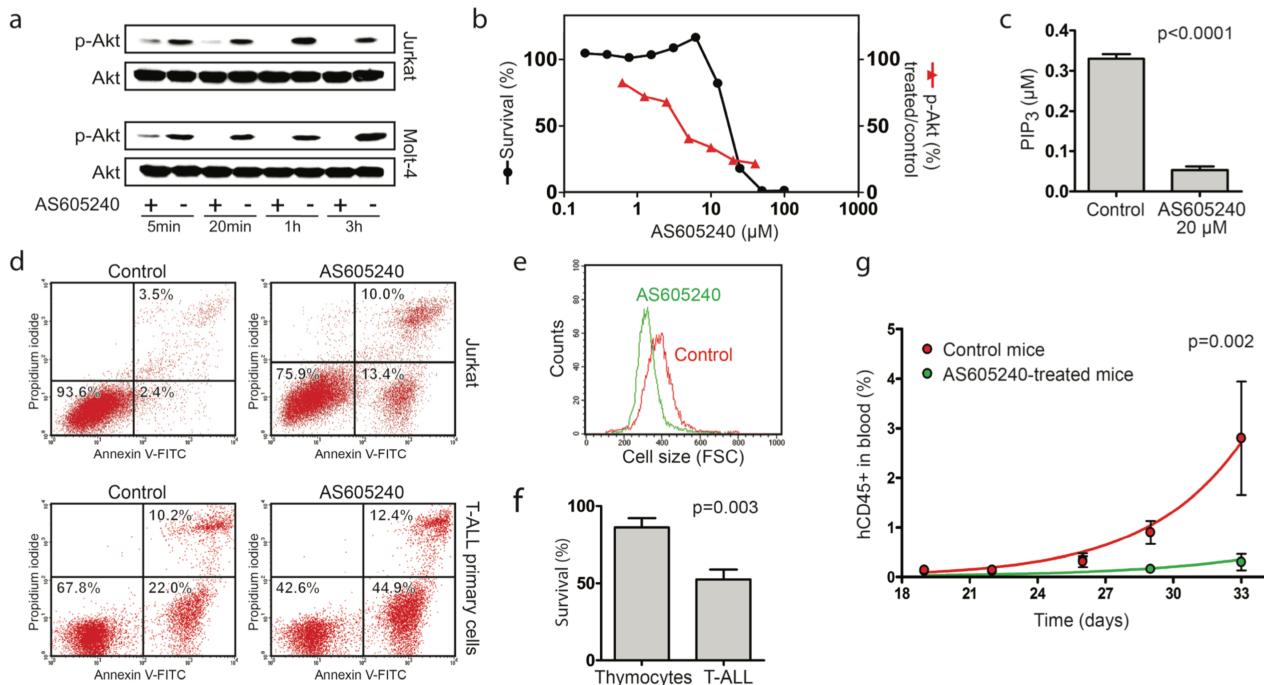


**Figure 2. PI3K activity is associated with worse clinical outcome in T-ALL.** (a) T-ALL patients were ranked according to a gene expression-based score of PI3K activity. Relapse, induction failure, and mutations in *PTEN* and *NOTCH1* genes are indicated as grey squares for each patient. (b-c) GSEA enrichment plots. Genes significantly downregulated by AS605240 had higher expression values in diagnostic T-ALL samples of patients who underwent induction failure or relapsed ( $n=6$ ), in comparison to samples of patients who entered remission and didn't relapse ( $n=18$ ) ( $p<0.05$  and  $FDR<0.05$ ).

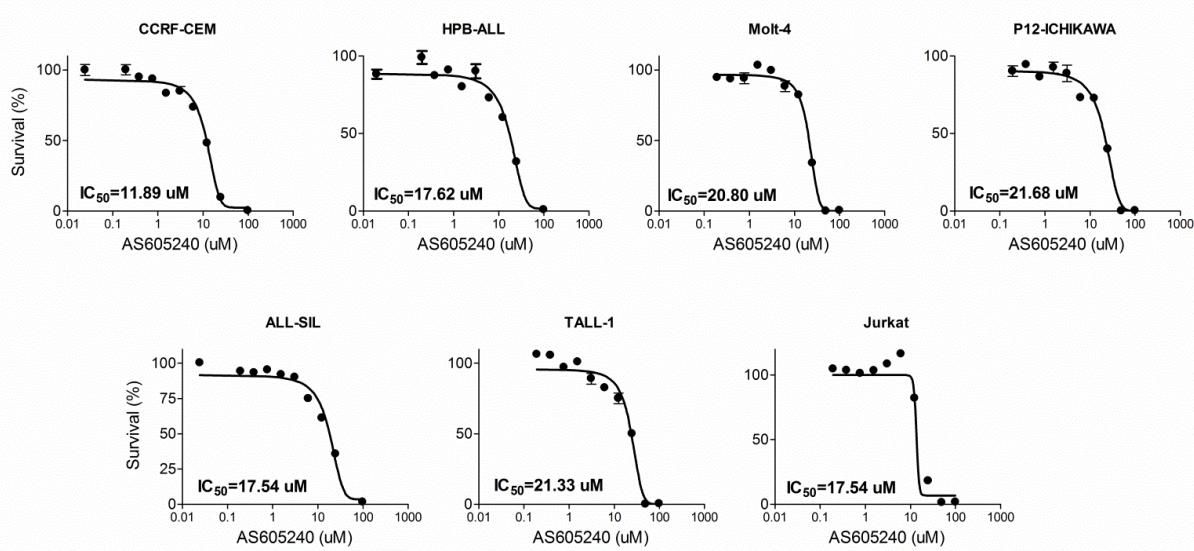
### **3.4.2 The PI3K inhibitor AS605240 shows anti-leukemic activity and prevents leukemic progression in T-ALL engrafted NOD/SCID mice**

Next, we sought to characterize the effects of AS605240 against T-ALL cells, with the goal of pre-clinically assessing the potential benefits of PI3K inhibition in T-ALL treatment protocols. AS605240 inhibited p-Akt (Figure 3a-b) and PIP<sub>3</sub> (Figure 3c) accumulation and promoted apoptosis in T-ALL cells (Figure 3b,d). The IC<sub>50</sub> value of AS605240 in 96h assays ranged from 12 to 22 µM depending on the T-ALL cell line tested (Supplementary Figure 5). The lower survival plateau reached zero in all cell lines and no correlation was found between IC<sub>50</sub> concentrations and *PTEN* mutational status (data not shown). Jurkat cells treated with AS605240 showed smaller cell volume than untreated cells (Figure 3e; Supplementary Figure 6), which is consistent with the inhibition of genes related to cellular growth (see above). Notably, T-ALL primary cells were significantly more sensitive to AS605240 than normal human thymocytes (Figure 3f).

To test the *in vivo* efficacy of AS605240 treatment, NOD/SCID mice were transplanted with primary T-ALL cells and randomized eleven days later to receive AS605240 (20mg/kg) or vehicle, intraperitoneally, 5 days a week. Mice treated with the PI3K inhibitor showed decreased leukemic progression in comparison to control mice, as evaluated by the percentage of human CD45+ cells in peripheral blood at different time points (Figure 3g).



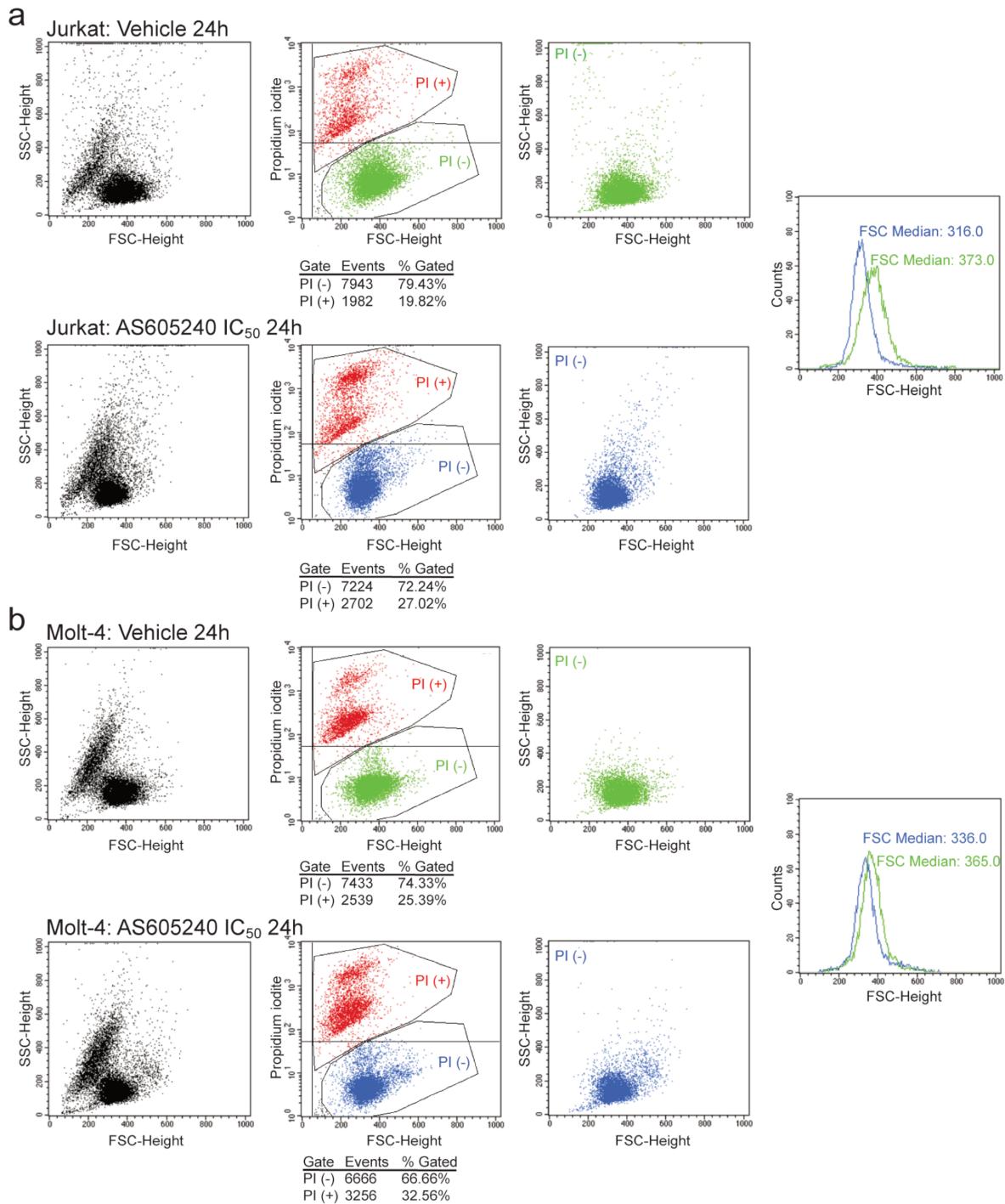
**Figure 3. AS605240 inhibited p-Akt and PIP<sub>3</sub> accumulation in T-ALL and showed anti-leukemic activity both *in vitro* and *in vivo*.** (a) Western blotting analysis using antibodies against Akt and p-Akt (Ser473) of Jurkat and Molt-4 cells treated with AS605240 IC<sub>50</sub> values or vehicle. (b) Effect in cell survival and p-Akt accumulation of increasing concentrations of AS605240 in Jurkat cells. Survival was assessed by the MTT assay after 96h of incubation. Quantification of p-Akt was performed with the AKT [pS473] ELISA Kit (Invitrogen) after 24h of incubation. (c) AS605240 inhibits PIP<sub>3</sub> accumulation, as assessed by PIP<sub>3</sub> mass ELISA quantification of Jurkat cells incubated for 24h with AS605240 or vehicle. Mann-Whitney was used for p-value calculation. (d) AS605240 induces apoptosis, as assessed by annexin V/PI double staining and flow cytometry analysis of Jurkat and primary T-ALL cells treated with AS605240 or vehicle for 8h and 6h, respectively. (e) AS605240 reduces cell volume. Histogram of FSC-Height values of propidium iodide negative cells. Jurkat cells were treated for 24h with the IC<sub>50</sub> value of AS605240 or vehicle, stained with propidium iodide and analyzed by flow citometry. (f) Primary T-ALL cells (n=7) are more sensitive to AS605240 than normal human thymocytes (n=7). Cells were incubated with 10  $\mu$ M of AS605240 for 48h and survival was assessed by the MTT assay. Mann-Whitney was used for p-value calculation. (g) AS605240 prevents leukemic progression in NOD/SCID mice engrafted with primary T-ALL cells derived from one T-ALL patient. Eleven days after the injection of 10<sup>7</sup> T-ALL cells, mice started to be treated with 20 mg/Kg of AS605240 intraperitoneally twice a day, 5 days per week. Peripheral blood proportion of human CD45+ cells was measured by flow cytometry analysis after red blood cells lysis. Exponential growth curves were compared with the F test of the best-fit K values. Error bars indicate the standard error of the mean (SEM).



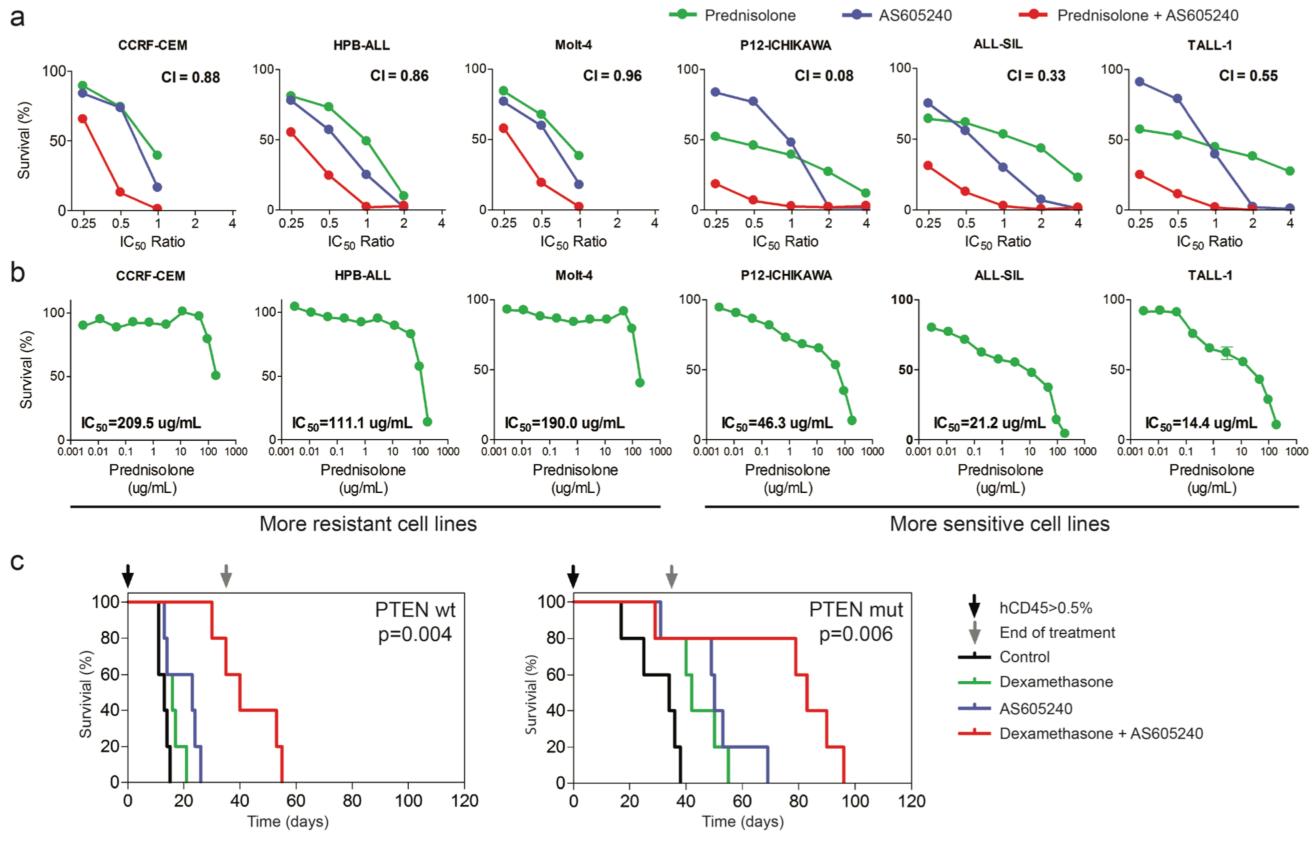
**Supplementary Figure 5.  $IC_{50}$  values of AS605240 for different T-ALL cell lines.** Survival of T-ALL cell lines incubated with increasing concentrations of AS605240 for 96h, as assessed by the MTT assay.  $IC_{50}$  values were calculated with the GraphPad Prism 5 software.

### 3.4.3 AS605240 synergizes with glucocorticoids both in vitro and in a mouse xenograft model of T-ALL

To further evaluate the clinical potential of PI3K inhibition for T-ALL treatment, we measured the cytotoxic effect of AS605240 in combination with commonly used chemotherapeutic drugs (Table 1). We observed a synergistic interaction between AS605240 and a glucocorticoid (prednisolone) in 6 out of 7 cell lines tested (Figure 4a-b). Accordingly, NOD/SCID mice engrafted with primary T-ALL cells showed enhanced survival when treated with a combination of AS605240 and another glucocorticoid (dexamethasone), in comparison to treatment with either drug alone (Figure 4c). Noteworthy, no difference was observed in weight loss of T-ALL transplanted NOD/SCID mice treated with AS605240 (30 mg/kg) versus dexamethasone (Supplementary Figure 7). In conclusion, our data strongly suggest that PI3K inhibition potentiates the activity of glucocorticoids against T-ALL cells both *in vitro* and *in vivo*.



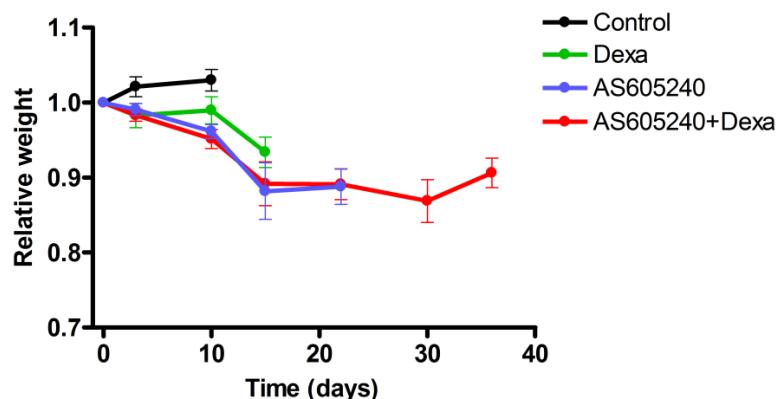
**Supplementary Figure 6. AS605240 treatment reduces leukemic cell size.** (a) Jurkat and (b) Molt-4 cells were treated for 24h with the respective IC<sub>50</sub> values of AS605240 or vehicle, stained with propidium iodide and analyzed by flow cytometry. Scatter plots with black dots represent total events acquire before gating. Cells identified as propidium iodide negative (PI-) were used to measure cell size (FSC-Height), in order to avoid sampling of necrotic cells (PI+). Histograms show FSC-Height values of AS605240-treated cells in blue, and control cells in green.



**Figure 4. AS605240 shows a synergistic interaction with prednisolone.** (a) MTT assay of T-ALL cell lines treated for 96h with several ratios of the  $IC_{50}$  values of AS605240, prednisolone or both. Combination Index (CI) was calculated with the CalcuSyn software. Synergistic effect is characterized by  $CI < 0.9$  and additive effect by  $0.9 > CI > 1.1$ . (b) MTT assay of T-ALL cell lines treated for 96h with increasing concentrations of prednisolone.  $IC_{50}$  values were calculated with the GraphPad Prism 5 software. (c) Each plot represents data obtained from NOD/SCID mice engrafted with T-ALL cells from only one patient. Mice were treated with 30 mg/Kg of AS605240 and/or 5 mg/Kg of dexamethasone intraperitoneally, once a day, 5 days a week. Treatment started when human CD45+ accounted for more than 0.5% of peripheral blood cells after red blood cells lysis.

**Table 1.** Combination Index (CI) between AS605240 and methotrexate (MTX), prednisolone (Pred), asparaginase (Asp) or daunorubicin (DNR) in T-ALL cell lines. MTT assay of cell lines treated for 96h with several ratios of the IC<sub>50</sub> values of each drug. Combination index (CI) was calculated with the CalcuSyn software. Synergistic effect is characterized by CI<0.9, additive effect by 0.9<CI<1.1 and antagonistic effect by CI>1.1. The columns named Pred, Asp, MTX and DNR represent results obtained with the simultaneous use of AS605240 and the respective drug. Columns MTX sched and DNR sched represent the scheduling scheme where AS605240 was added to culture media 48h after the respective drug.

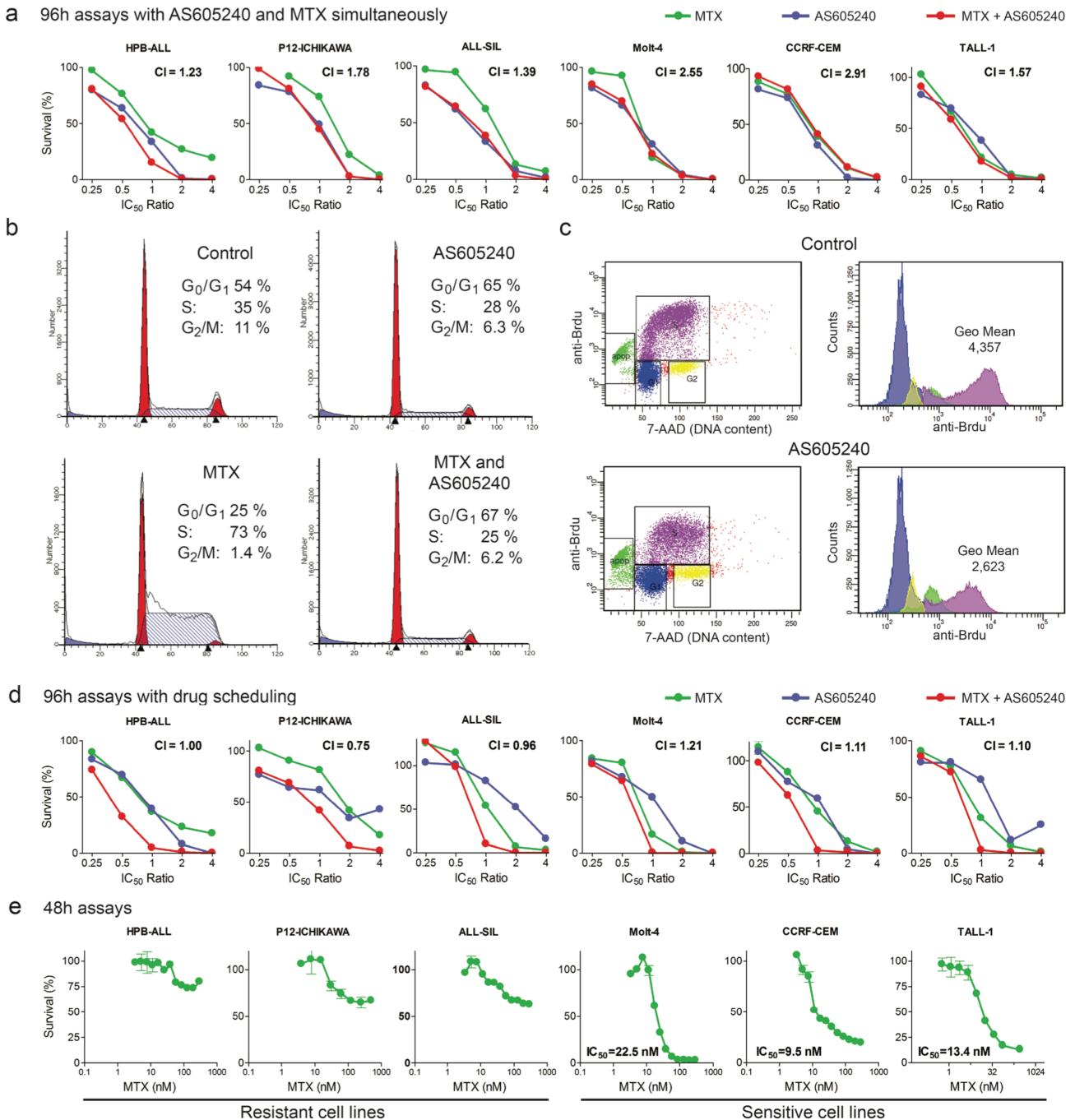
Cell line	Combination index (CI)					
	Pred	Asp	MTX	MTX sched	DNR	DNR sched
<b>CCRF-CEM</b>	0.88	0.84	2.91	1.11	1.76	1.67
<b>HPB-ALL</b>	0.86	1.48	1.23	1.00	1.07	-
<b>Jurkat</b>	-	1.07	-	1.62	2.10	-
<b>Molt-4</b>	0.96	1.07	2.55	1.21	1.48	-
<b>P12-ICHIKAWA</b>	0.08	0.93	1.78	0.75	1.27	0.89
<b>ALL-SIL</b>	0.33	1.35	1.39	0.96	1.12	-
<b>TALL-1</b>	0.55	0.94	1.57	1.10	1.63	0.89



**Supplementary Figure 7. Relative weight of T-ALL xenografted NOD/SCID mice treated with vehicle, AS605240 and/or dexamethasone.** Relative weight was here defined as the animal's weight divided by its weight immediately before start of treatment. NOD/SCID mice were engrafted with 1x10<sup>7</sup> primary T-ALL cells via tail vein injection. Treatment started when human CD45+ accounted for more than 0.5% of peripheral blood cells after red blood cells lysis, as measured by flow cytometry. Mice were treated with 30 mg/Kg of AS605240 and/or 5 mg/Kg of dexamethasone, intraperitoneally, once a day, 5 days a week.

### **3.4.4 PI3K inhibition requires scheduling when combined with drugs that target dividing cells**

Surprisingly, AS605240 showed an antagonistic interaction *in vitro* with both MTX (Table 1; Figure 5a) and DNR (Table 1) in all cell lines tested. MTX is an antimetabolite that allosterically inhibits dihydrofolate reductase (DHFR), which participates in the synthesis of tetrahydrofolate, an essential molecule for the biosynthesis of purines, thymidylate and several amino acids.<sup>91</sup> MTX acts specifically during DNA and RNA synthesis, and thus it is cytotoxic during the S-phase of the cell cycle. Part of the antagonistic interaction between AS605240 and MTX may result from AS605240-induced G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> cell cycle arrest, which decreases the number of S-phase MTX-susceptible cells (Figure 5b, Table 2). However, cell division was not completely abrogated by AS605240. BrdU incorporation assays showed decreased rate of nucleotide incorporation during S-phase in Jurkat, Molt-4 and P12-ICHIKAWA cells after 24h treatment with AS605240 (Figure 5c, Table 2). The lower rate of DNA duplication in AS605240-treated cells may contribute to increased tolerance to lower nucleotide availability under MTX treatment.<sup>92</sup> Altogether, these results indicate that both AS605240-induced cell cycle arrest at G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> and the lower rate of DNA replication may contribute to the antagonistic interaction between AS605240 and MTX.



**Figure 5.** AS605240 showed an antagonistic interaction with MTX, which could be successfully circumvented by means of proper drug scheduling. **(a)** AS605240 shows an antagonistic interaction with MTX when drugs are administered concomitantly. MTT assay of T-ALL cell lines treated for 96h with several ratios of the IC<sub>50</sub> values of AS605240, MTX or both. Combination index (CI) calculated with the CalcuSyn software. Synergistic interaction, CI<0.9; additive interaction, 0.9<CI<1.1; antagonistic interaction, CI>1.1. **(b-e)** Next page.

**Figure 5.** (b) AS605240 reduces the percentage of cells in S and completely abrogates MTX-induced S-phase arrest. Molt-4 cells were incubated with the IC<sub>50</sub> values of AS605240 and/or MTX for 24h. Cells were ethanol fixed, propidium iodide stained and analyzed by flow cytometry. (c) AS605240 reduces BrdU nucleotide incorporation, as shown by reduced anti-BrdU fluorescence intensity of S-phase cells (pink) in Jurkat, P12-ICHIKAWA and Molt-4 cells. Cell lines were treated with AS605240 IC<sub>50</sub> value for 24h. Representative plots of P12-ICHIKAWA cells are shown. BD BrdU Flow Citometry Assay Kit (Becton Dickinson and Company) was used to quantify BrdU incorporation. (d) AS605240 shows an additive/synergistic interaction with MTX when the PI3K inhibitor is added 48h after those drugs (5 out of 7 cell lines tested) in a 96h MTT assay of T-ALL cell lines treated with several ratios of the IC<sub>50</sub> values of AS605240, MTX or both. (e) MTT assay of T-ALL cell lines treated for 48h with increasing concentration of MTX. IC<sub>50</sub> values were calculated with the GraphPad Prism 5 software.

**Table 2.** AS605240 induces G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> cell cycle arrest and reduces BrdU nucleotide incorporation in T-ALL cell lines. Each cell line was treated with the IC<sub>50</sub> value of AS605240 for 24h and incubated with BrdU for 30 min. Percentage of cells in each phase of the cell cycle and BrdU incorporation were measured with the BD BrdU Flow Citometry Assay Kit and flow cytometry analysis.

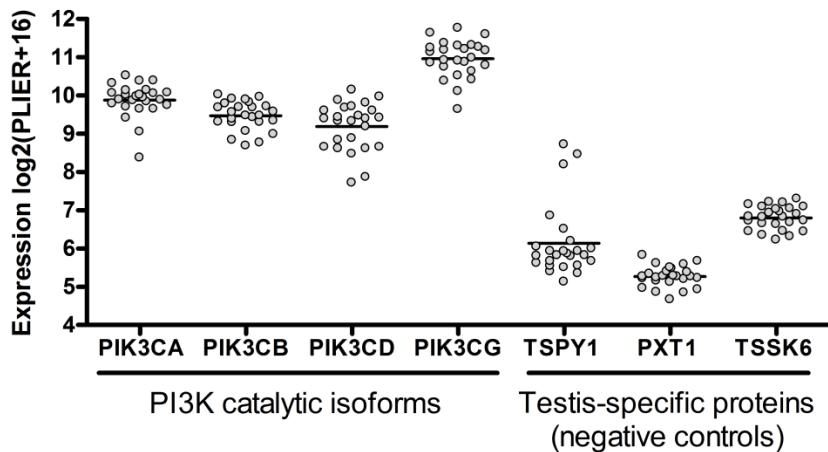
Cell line	Treatment	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> (%)	S (%)	G <sub>2</sub> /M (%)	BrdU in S (Geo Mean)
<b>Jurkat</b>	Control	48.1	37.8	7.4	2.736
	AS605240	55.6	3.3	20.7	1.732
<b>Molt-4</b>	Control	47.0	45.1	4.1	4.751
	AS605240	63.8	27.1	4.2	3.587
<b>P12-ICHIKAWA</b>	Control	45.8	37.5	6.6	4.357
	AS605240	48.3	26.2	9.6	2.623

Based on these evidences, we explored alternative administration schedules to find possible therapeutic windows for AS605240 use in the context of modern ALL treatment protocols, which include MTX and other anticancer drugs that target dividing cells. AS605240 showed synergistic/additive interaction with MTX (5 out of 7 cell lines tested) or DNR (2 out of 3 cell lines tested) when added 48h after these drugs (Figure 5d, Table 1). Noteworthy, when using this schedule, the most synergistic interactions were observed for the cell lines (HPB-ALL, CI=1.0; P12-ICHIKAWA, CI=0.76; ALL-SIL, CI=0.96) found to be resistant to MTX in a 48h assay (Figure 5e). Overall, our data indicate that scheduling is of major importance when considering introducing PI3K inhibitors in T-ALL treatment schemes with chemotherapeutic drugs that require cell division.

### 3.5 DISCUSSION

Aberrant activation of PI3K signaling pathways has been implicated in many types of cancer.<sup>93</sup> PTEN mutations and elevated Akt activity were found to be associated with poor prognosis in solid tumors<sup>94,95</sup> and T-ALL.<sup>69,70</sup> In this study, the combined use of gene expression signatures reflecting PI3K inhibition in T-ALL cell lines and primary cells allowed us to score the level of PI3K activity in diagnostic samples, showing for the first time that patients who failed induction therapy or relapsed displayed higher PI3K pathway activity.

Given that PI3K $\gamma$  is predominantly expressed in the hematopoietic system,<sup>52</sup> the use of a PI3K $\gamma$  specific inhibitor could offer an innovative rationale-based therapeutic strategy for T-ALL. AS605240 was previously described as an isoform-selective ATP-competitive inhibitor of PI3K $\gamma$  with 30-fold selectivity over PI3K $\delta$  and  $\beta$ , and 7.5-fold selectivity over PI3K $\alpha$ .<sup>73</sup> However, we found that AS605240 did not have cytotoxic effects against T-ALL cells at concentrations expected to inhibit solely PI3K $\gamma$  (0.1-0.2  $\mu$ M),<sup>73</sup> being cytotoxic only at concentrations high enough to inhibit more than 70% of p-Akt accumulation (Figure 3b), presumably disrupting the activity of several PI3K isoforms. All PI3K p110 subunits are highly expressed in primary T-ALL cells (Supplementary Figure 8) and evidence points to roles of PI3K $\alpha$ ,  $\gamma$  and  $\delta$  in T-ALL leukemogenesis,<sup>69,96</sup> suggesting that multiple isoforms of PI3K might play a role in T-ALL.

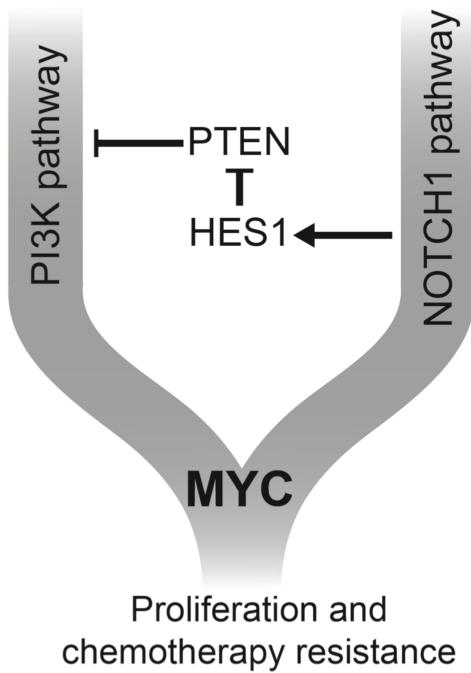


**Supplementary Figure 8. All p110 catalytic subunits of PI3K (*PIK3CA*, *PIK3CB*, *PIK3CD* and *PIK3CG*) are highly expressed in primary T-ALL.** Global gene expression of 24 T-ALL samples collected at diagnosis was measured with the Human Gene 1.0 ST arrays. Testis-specific protein genes are shown as negative controls (*TSPY1*, *PXT1* and *TSSK6*).

AS605240 was more selective to leukemic cells than to normal thymocytes and was able to prevent primary T-ALL progression in mice. AS605240 may be given to mice for months without inducing generalized toxicity,<sup>74</sup> which would indicate the feasibility of AS605240 use to treat T-ALL patients. However, we observed that mice had mobility difficulties and remained immobile for several minutes after AS605240 administration (Supplementary Video). Experiments to test whether AS605240 crosses the blood-brain barrier and to address its potential neurotoxic side effects are warranted.

PI3K inhibition significantly affected the expression of genes related to cellular growth. Accordingly, Myc protein levels and Myc-dependent transcription were downregulated in response to PI3K inhibition. Previous studies have highlighted the importance of Myc as a downstream effector of Notch1 mediated leukemogenesis.<sup>39,97</sup> The PI3K and Notch1 pathways were shown to be interconnected by PTEN. Notch1 induces *HES1* expression, which in turn represses *PTEN* transcription (Figure 6).<sup>66,67</sup> Importantly, although controversial,<sup>98</sup> there is evidence that *PTEN* loss induces resistance to Notch1 gamma-secretase

inhibitors (GSI) in T-ALL.<sup>66</sup> In this work we observed that Myc is a downstream convergence point of the Notch1 and PI3K pathways (Figure 6). In GSI-sensitive T-ALL cell lines, overexpression of Myc rescues the growth inhibition induced by GSI.<sup>39</sup> These observations, which suggest that Myc is an attractive target for therapeutic intervention in T-ALL, gains further relevance in light of recent data indicating that Myc may be upregulated in T-cell leukemia initiating cells,<sup>87</sup> and that small molecule inhibition of Myc has therapeutic potential in the treatment of multiple myeloma,<sup>99</sup> and B- and T-ALL.<sup>87,100</sup>



**Figure 6. Interplay between Notch1 and PI3K pathways in T-ALL.** The Notch1 and PI3K pathways are integrated by Myc in T-ALL to induce proliferation and chemotherapy resistance. Notch1 activates PI3K activation via Hes1, which negatively controls the expression of PTEN.<sup>47</sup>

Glucocorticoids play a role of great importance in contemporary ALL treatment protocols. Early response to glucocorticoids is an informative prognostic factor in childhood ALL<sup>101</sup> and glucocorticoid resistance is a well-documented feature of relapse,<sup>64,102</sup> which was previously associated with a proliferative phenotype involving upregulation of glycolysis, cholesterol biosynthesis, and

activation of PI3K/Akt/mTOR and Myc signaling pathways.<sup>88,103</sup> Indeed, fast growing T-ALL cell lines are more resistant to both prednisolone and dexamethasone.<sup>88</sup> Previous studies observed a synergistic interaction between rapamycin and dexamethasone in T-ALL.<sup>63,104</sup> Moreover, the PI3K inhibitor LY294002 sensitized MLL-rearranged ALL cells to prednisolone *in vitro*.<sup>105</sup> In the present study, we showed that PI3K inhibition promotes downregulation of metabolic and biosynthesis pathways towards a gene expression profile more typical of glucocorticoid sensitive ALL cases. The PI3K inhibitor AS605240 synergized with glucocorticoids *in vitro* and the combined use of AS605240 and dexamethasone enhanced survival of mice engrafted with T-ALL. We observed no difference between PTEN mutated and wild-type transplanted leukemias with respect to AS605240 effect, suggesting that T-ALL patients may benefit from PI3K inhibition irrespectively of PTEN mutational status. Notably, we observed that T-ALL cell lines intrinsically more resistant to prednisolone (CCRF-CEL, HPB-ALL and Molt-4) showed weaker synergism between AS605240 and prednisolone, characterized by smaller Combination Index (CI) values (Figure 4a-b). This suggests that the PI3K pathway is not the only pathway underlying glucocorticoid resistance, corroborating previous findings.<sup>106</sup> Recent clinical and preclinical studies have shown that RAS mutations limit the effectiveness of PI3K inhibitors.<sup>107,108</sup>

AS605240 showed an antagonistic interaction with MTX and DNR when both drugs were administered simultaneously to cell cultures. MTX kills growing tumor cells by limiting their supply of dTTP and purine nucleotides, which leads to DNA repair defects, DNA strand breaks and apoptosis. MTX-induced DNA strand break accumulation is minimal in growth-arrested tumor cells.<sup>92</sup> The anthracycline DNR increases the levels of topoisomerase II:DNA covalently bound complexes, generating DNA double strand breaks and inducing apoptosis. Anthracyclines appear to be particularly toxic during S-phase, when replication forks and transcription complexes are both present.<sup>109</sup> Our results showed that PI3K inhibition in leukemia cell lines not only induces cell cycle arrest at G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, but also decreases DNA synthesis rate during cell division. This cytostatic effect is probably

responsible for the tolerance exhibited by AS605240-treated cells to MTX and DNR, which nevertheless could be successfully circumvented by means of proper drug scheduling.

Recent evidence shows that genes most significantly correlated with ALL resistance to prednisolone are inversely correlated with MTX resistance, suggesting that the transcriptional networks underlying resistance to one drug may actually sensitize cells to the other. Translation was suggested as one critical pathway determining the balance between glucocorticoid and MTX sensitivity in T-ALL.<sup>110</sup> We now provide evidence that this disparate prednisolone/MTX transcriptional profile is under PI3K pathway control.

In summary, our gene expression analysis indicated that PI3K activity is associated with chemotherapy resistance in T-ALL. Accordingly, PI3K inhibition sensitized T-ALL cells to glucocorticoids both *in vitro* and *in vivo*. Furthermore, our data indicate that correct scheduling will be of upmost importance when combining PI3K inhibitors with drugs targeting dividing cells, which are mainstream in current protocols against T-ALL.

### **3.6 ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by grants from FAPESP (08/10034-1) to JAY. ABS and ABAL were supported by CNPq and FAPESP fellowships, respectively. We acknowledge the Laboratório Nacional de Biociências for the use of the microarrays facility. We are especially grateful to the contribution of patients and their families.

## CAPÍTULO II: EXPERIMENTOS COMPLEMENTARES

### 3.7 MÉTODOS COMPLEMENTARES

#### 3.7.1 Classificação segundo subtipos moleculares de LLA-T.

Os dados de expressão global de 24 amostras ao diagnóstico de LLA-T obtidos com microarranjos Human Gene 1.0 ST (Affymetrix) foram utilizados para classificação de acordo com os subtipos moleculares de LLA-T previamente descritos.<sup>111</sup> Os valores de expressão de uma lista de classificadores positivamente ou negativamente associados com cada subtipo<sup>111</sup> foi utilizado para agrupamento das amostras através de *hierarchical clustering* com o software MultiExperiment Viewer (<http://www.tm4.org/mev.html>).

#### 3.7.2 *Western blotting*.

Células das linhagens de LLA-T Jurkat e Molt-4 ( $6 \times 10^6$ ) foram cultivadas com os respectivos valores de IC<sub>50</sub> de AS605240 ou veículo por diversos períodos de tempo. As células foram lisadas com 60 µL de tampão *ripa-like* (deoxicolato de sódio 5 mg/mL, Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCL 150 mM, EDTA 5 mM, Igepal 1%, SDS 0,1%, Phosphatase inhibitor cocktail I [Sigma] 1%, Phosphatase inhibitor cocktail II [Sigma] 1%, Protease inhibitor cocktail [Sigma] 1%, PMSF 1%, em PBS) e centrifugadas a 2.400 rcf por 5 min a 4°C para precipitação de restos celulares. A concentração de proteínas do sobrenadante foi quantificada pela técnica de Lowry com BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL, EUA), utilizando como referência uma curva de albumina do soro bovino (BSA) em tampão *ripa-like*. A quantidade de 100 µg de proteínas de cada amostra foi submetida a SDS-page com gel de poliacrilamida 10%. As proteínas foram transferidas para membranas

de nitrocelulose ( $0,45\text{ }\mu\text{m}$ ), que foram então bloqueadas com 2% leite em pó desnatado em tampão TBS-T por 1h sob agitação à temperatura ambiente. As membranas foram lavadas 3 vezes com TBS-T, incubadas por 16h a  $4^\circ\text{C}$  com anticorpo primário em TBS-T com 5% de BSA, novamente lavadas 3 vezes com TBS-T e finalmente incubadas por 1h à temperatura ambiente com anticorpo anti-coelho conjugado a peroxidase (A6154-5ML, Sigma) em TBS-T com 5% de leite em pó desnatado. Foram utilizados os anticorpos primários (Cell Signaling Technology) contra p-Akt (Ser473, #4060), Akt (#4691), p-Erk1/2 (Thr202/Tyr204, #9101), Erk1/2 (#9102), p-Mek1/2 (Ser217/221, #9121), p-c-Raf (Ser259, #9421), p-c-Raf (Ser338, #9427), p-CREB1/CREM/ATF1 (Ser133/87/63, #) e CREB1 (#9197).

### **3.7.3 PCR quantitativo.**

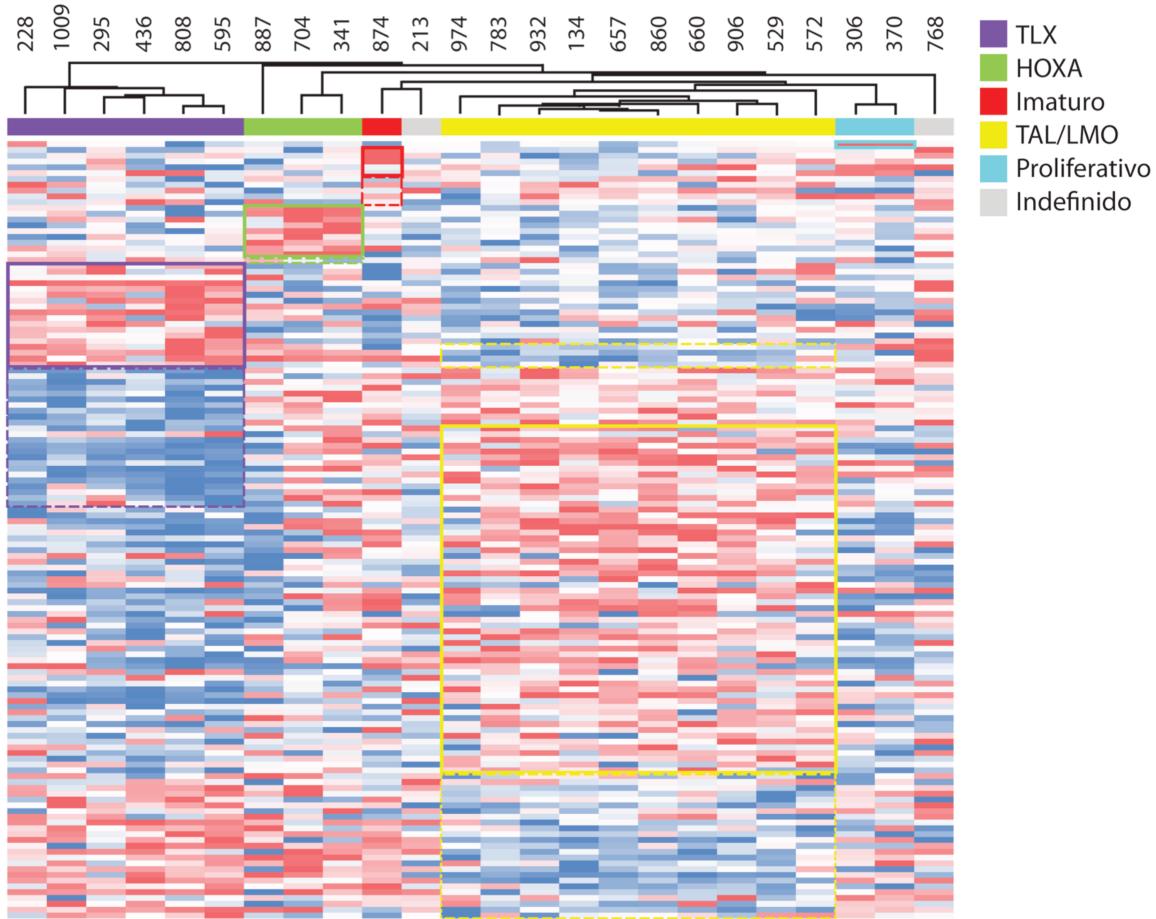
Células de Jurkat ( $5\times 10^6$ ) foram tratadas com  $\text{IC}_{50}$  de AS605240 ou veículo por 3-12h. As células foram lavadas com PBS gelado e coletadas por centrifugação a  $4^\circ\text{C}$  antes da extração de RNA com kit Illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare). As amostras de RNA total quantificadas com Qubit RNA BR Assay Kit (Invitrogen). O kit de extração de RNA utilizado possui passo de digestão de DNA. No entanto, genes de histonas não possuem íntrons, impossibilitando o desenho de *primers* que amplificariam apenas cDNA e não DNA genômico. Desta maneira, optamos por uma digestão adicional de 2  $\mu\text{g}$  de RNA total com TURBO DNA-free DNase Treatment and Removal Reagent (Ambion), material que foi então submetido à síntese de cDNA com ImProm-II Reverse Transcription System (Promega) com hexâmeros randômicos ou primer T7-oligodT, este proveniente do One-Cycle Target Labeling and Control Reagents Kit (Affymetrix). O volume de 5  $\mu\text{L}$  de cada amostra de cDNA diluída 20-30x em água foi analisado em reações de PCR quantitativo com volume final de 15  $\mu\text{L}$ . Para tal, foi utilizado o FastStart Universal SYBR Green Master Mix (Roche) em equipamento StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Foram utilizados os seguintes *primers* específicos para quatro genes de histonas

dependentes de replicação: *HIST1H2AG* (*forward* GCTGCTGGCAAAGTCAC, *reverse* GTTGGTTGGACTCGATTAC), *HIST1H2AC* (*forward* AGCTCAACAAA CTGCTAGGC, *reverse* TGGGTTGATAGCGTTCC), *HIST1H2AJ* (*forward* ATCCCGCGTCACCTCCAG, *reverse* CGCTTTCAACTCGGTCTTACT) e *HIST1H3C* (*forward* TCGAAGACACCAATCTGTGC, *reverse* AGAGCCTTTCAAT GAGGAAG). Como controle endógeno, foi utilizado o gene *ABL* com os *primers* ENF1003 e ENR1063.<sup>112</sup> Os valores de expressão foram obtidos por  $\Delta\Delta Ct$  (User Bulletin #2 ABI P RISM 7700 Sequence Detection System).

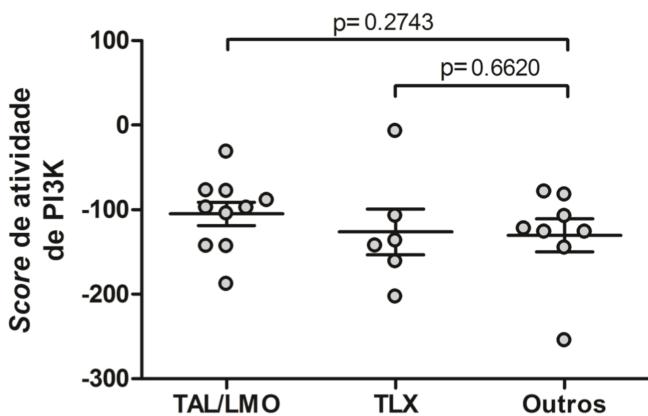
## 3.8 RESULTADOS COMPLEMENTARES

### 3.8.1 Associação entre atividade de PI3K e subtipos moleculares de LLA-T

Os dados de expressão global de 24 amostras ao diagnóstico de LLA-T, obtidas de pacientes do Centro Infantil Boldrini tratados segundo o protocolo GBTLI ALL-99,<sup>75</sup> foram utilizados para classificar cada paciente entre os diversos subtipos moleculares de LLA-T previamente descritos. Para tal, foi utilizada uma lista de classificadores positivamente ou negativamente associados à cada subtipo (Figura 3).<sup>111</sup> O score de atividade de PI3K, obtido também pelos dados de expressão global de cada paciente, não foi significativamente correlacionado aos subtipos moleculares TAL/LMO ou TLX (Figura 4). Devido ao número reduzido de pacientes nos demais subtipos, não foi possível a mesma análise com cada um deles separadamente.



**Figura 3. Subtipos moleculares de 24 amostras de LLA-T ao diagnóstico segundo dados de expressão gênica global.** Lista de genes positivamente (linhas cheias) ou negativamente (linhas tracejadas) associados a cada subtipo molecular de LLA-T (segundo cores) foram utilizados para caracterizar grupos de amostras obtidos por *hierarchical clustering*.

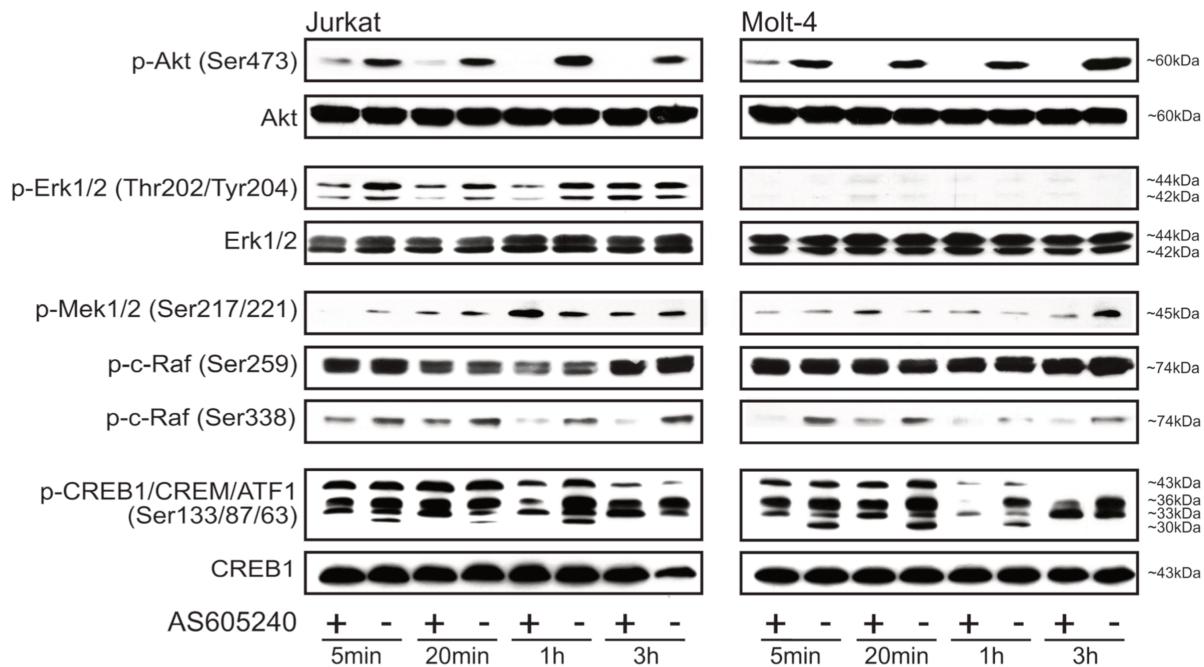


**Figura 4. Subtipos moleculares de LLA-T não estão associados ao score de atividade de PI3K.** Score de PI3K definido a partir da expressão dos genes que compõem as assinaturas de PI3K obtidas em linhagens e células primárias de LLA-T tratadas com inibidor de PI3K AS605240 ou veículo. Os p-valores indicam resultados de testes Mann-Whitney.

### **3.8.2 Respostas de feedback perante inibição de PI3K**

PI3K foi descrita como um regulador chave da ativação da via Ras/Raf/Mek/Erk.<sup>113,114</sup> Desta forma, procuramos definir o perfil de ativação de *extracellular signal-regulated kinases 1 and 2* (Erk1/2) em linhagens de LLA-T tratadas com o inibidor de PI3K AS605240. Análise de *western blotting* mostrou que AS605240 inibiu a fosforilação de Erk1/2 em células Jurkat entre 5 min e 1h de tratamento (Figura 5). No entanto, após 3h de tratamento com AS605240, quando a fosforilação de Akt foi mínima, os níveis basais de p-Erk1/2 foram completamente reestabelecidos, sugerindo uma resposta de *feedback* perante inibição da via da PI3K.

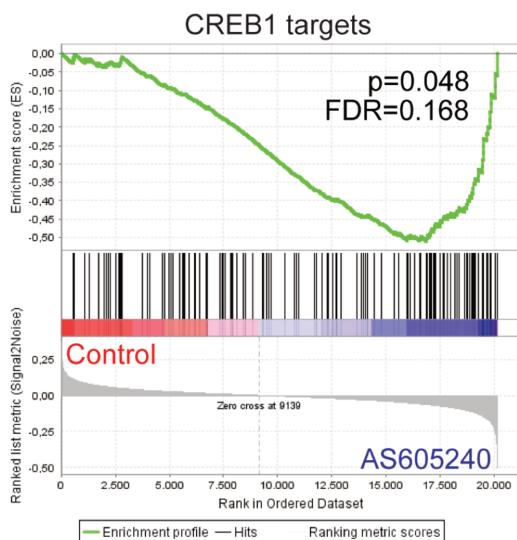
Notavelmente, a modulação de fosforilação de Erk1/2 ocorreu de forma Mek1/2 independente (Figura 5). PI3K foi previamente descrita como capaz de regular c-Raf através de fosforilação da Ser338.<sup>115</sup> Tratamento de Jurkat e Molt-4 com AS605240 resultou em queda na fosforilação da Ser338 de c-Raf (Figura 5). No entanto, o padrão temporal de modulação da fosforilação não foi similar ao de Mek1/2. Ainda, não observamos modulação de fosforilação da Ser259 do domínio regulatório de c-Raf, alvo da atividade de quinase de Akt.<sup>116</sup> Em conjunto, estes resultados argumentam que o reestabelecimento dos níveis basais de sinalização de Erk1/2 após 3h de inibição de PI3K é um processo independente de Raf e Mek1/2.



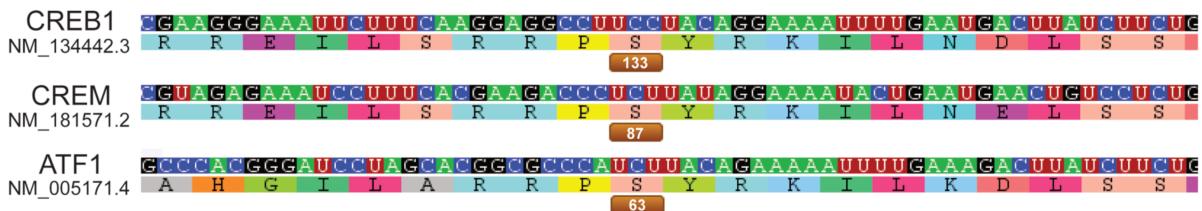
**Figura 5. AS605240 modula a fosforilação de diversos componentes das vias Raf/Mek/Erk e CREB1/CREM/ATF1.** Células de LLA-T foram tratadas com o IC<sub>50</sub> do inibidor de PI3K AS605240, lisadas em tampão ripa-like e submetidas a análise de western blotting.

Análise de GSEA mostrou que alvos do fator de transcrição cAMP responsive element binding protein 1 (CREB1),<sup>117</sup> um mediador da sinalização por Erk,<sup>118</sup> foram induzidos por AS605240 após 6h de tratamento em linhagens de LLA-T ( $p=0.048$ , FDR=0.168; Figura 6). Apenas as formas fosforiladas do fator de transcrição interagem com coativadores necessários para recrutar a maquinaria basal de transcrição. Desta forma, realizamos análises de western blotting utilizando anticorpo anti-p-CREB1 em células de LLA-T tratadas com AS605240 ou veículo. CREB1 faz parte de uma subfamília de fatores de transcrição bZIP que inclui cAMP-responsive element modulator (CREM) e activating transcript factor 1 (ATF1). Devido à similaridade das sequências de aminoácidos no sítio de fosforilação das proteínas CREB1 (Ser133), CREM (Ser87) e ATF1 (Ser63; Figura 7), o anticorpo utilizado para as análises (#9198, Cell Signaling Technology) reconhece igualmente os três fatores de transcrição. Tratamento de células Jurkat e Molt-4 com AS605240 resultou em modulação da fosforilação destes fatores de

transcrição de maneira tempo-dependente (Figura 5). AS605240 inibiu a fosforilação de um peptídeo de ~30 kDa (5 min, 20 min e 1h) e outro de ~36 kDa (1h e 3h). Em contraste, AS605240 induziu fosforilação de um peptídeo de ~33 kDa (20 min; Figura 5). Não foi possível, no entanto, diferenciar quais isoformas de quais genes foram afetadas pelo tratamento com o inibidor de PI3K. Em conjunto, estes dados indicam que células de LLA-T estão submetidas à ativação compensatória de Erk/CREB1 perante inibição de PI3K.



**Figura 6. AS605240 induz a transcrição de alvos de CREB1 em linhagens de LLA-T.** Gráfico de enriquecimento de análise de GSEA. Células de linhagens de LLA-T tratadas por 6h com IC<sub>50</sub> de AS605240 ou veículo foram submetidas a análise de expressão global com microarranjos Affymetrix (HG-U133 Plus 2.0).

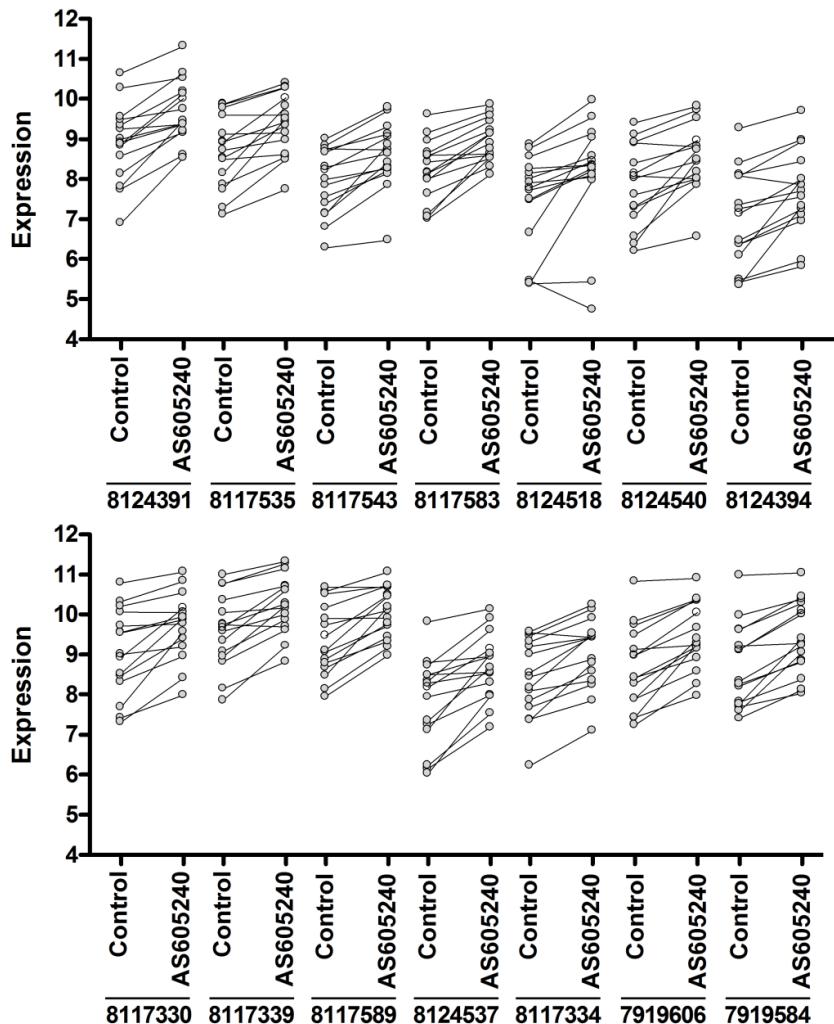


**Figura 7. Os sítios de fosforilação de CREB1 (Ser133), CREM (Ser87) e ATF1 (Ser63) apresentam alta similaridade na sequência de aminoácidos.**

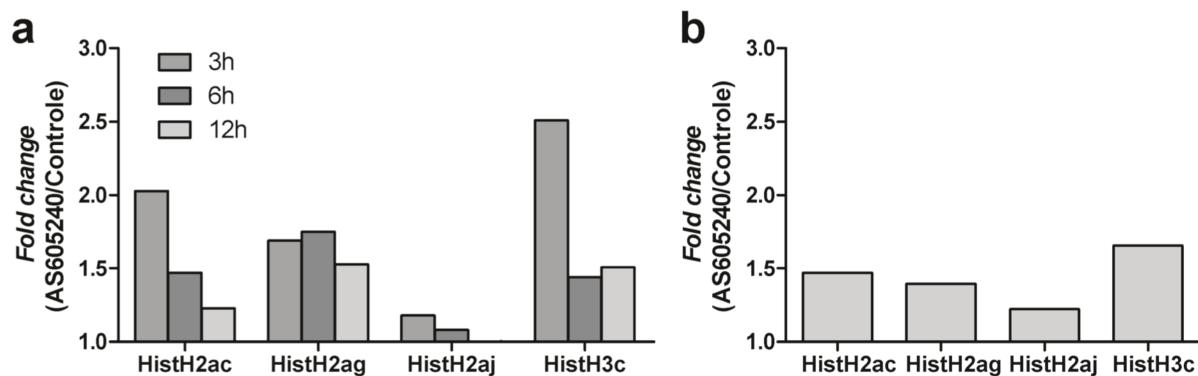
### **3.8.3 AS605240 induz expressão de histonas dependentes de replicação**

Dentre os genes definidos como alvos de CREB1, muitos representam genes de histonas dependentes de replicação, que possuem regiões CRE em seus promotores.<sup>117</sup> Nossos dados de expressão global mostraram que diversos genes de histonas foram consistentemente induzidos em resposta a inibição de PI3K tanto em células primárias (Supplementary Table 1 [Anexo 4]; Figura 8) como em linhagens celulares de LLA-T (Supplementary Table 2 [Anexo 5]). PCR quantitativo confirmou a indução da expressão de quatro diferentes genes de histonas em células Jurkat após 3h a 12h de tratamento com AS605240 (*Fold change*>1; Figura 9a).

É importante ressaltar que os microarranjos utilizados para avaliação do perfil de expressão gênica em linhagens se baseiam em tecnologia na qual as sondas são desenhadas na porção 3' dos transcritos interrogados (HG-U133 Plus 2.0 arrays). O passo inicial para preparação das amostras a serem hibridizadas nos microarranjos consiste em síntese de cDNA utilizando *primers* T7-oligodT, de maneira que o cDNA obtido é primordialmente proveniente de RNAs poliadenilados, excluindo RNA ribossômico, por exemplo. Histonas dependentes de replicação não possuem íntrons e geralmente não são poliadenilados, contendo apenas uma região conservada de 16 nucleotídeos com estrutura *stem-loop* na extremidade 3'. No entanto, diversos estudos mostraram que perda do processamento correto da porção 3' podem resultar na produção de RNAm poliadenilados de genes de histonas dependentes de replicação.<sup>119-121</sup> De forma a quantificar os níveis de RNAm poliadenidados, realizamos PCR quantitativo a partir de cDNAs sintetizados com *primers* T7-oligodT, ao invés de hexâmeros randômicos (N6). Células Jurkat tratadas por 3h com AS605240 demonstraram aumento dos níveis de RNAm poliadenilado de quatro diferentes histonas dependentes de replicação (*Fold change*>1; Figura 9b).



**Figura 8. AS605240 induz a expressão de diversos genes de histonas dependentes de replicação.** Células primárias colhidas ao diagnóstico de 15 pacientes de LLA-T foram tratadas por 6h com 20  $\mu$ M de AS605240 ou veículo e submetidas a análise de expressão global com microarranjos Affymetrix (Human Gene 1.0 ST). Estão representados no gráfico os genes de histonas identificados como diferencialmente expressos perante tratamento com AS605240 (*Fold change*>1.5; *p*-valor ajustado<0.05). Cada par de círculos conectados por uma linha corresponde a um paciente.



**Figura 9. AS605240 induz a expressão de RNAm poliadenilado de genes de histonas dependentes de replicação.** Células de Jurkat foram tratadas com IC<sub>50</sub> de AS605240 ou veículo por 3-12h. O RNA obtido foi submetido a sínteses de cDNA com (a) hexâmeros randômicos ou (b) primers T7-oligodT, material utilizado para PCR quantitativo de quatro genes de histonas. Não foram realizadas réplicas para este experimento.

## 4. DISCUSSÃO GERAL

A via da PI3K apresenta ativação aberrante em diversos tipos de câncer,<sup>93</sup> contribuindo para a progressão tumoral através da modulação de múltiplos alvos associados ao controle de apoptose, proliferação, diferenciação e metabolismo.<sup>62</sup> Na LLA-T, pacientes com mutações em *PTEN* apresentam risco elevado de falha na terapia de indução e recaída.<sup>69,70</sup> É desconhecido, no entanto, o real impacto clínico da atividade da via PI3K *per se* em amostras de LLA-T. Neste estudo, definimos assinaturas gênicas que refletem a atividade da via P3K, através de análise de expressão em células de LLA-T tratadas ou não com o inibidor específico de PI3K AS605240. Para tal, utilizamos 7 linhagens de LLA-T (ALL-SIL, HPB-ALL e TALL-1, que possuem *PTEN* selvagem; P12-ICHIKAWA, CCRF-CEM, Jurkat e Molt-4, que possuem *PTEN* mutante)<sup>98,122,123</sup> e células primárias de 15 pacientes de LLA-T (dois dos quais *PTEN* mutantes). Notavelmente, o status mutacional de *PTEN* para estas células não alterou ao inibidor de PI3K no que diz respeito ao perfil de expressão gênica global.

Estas assinaturas foram utilizadas para a classificação de amostras de LLA-T ao diagnóstico segundo um *score* de ativação da via baseado no perfil de expressão gênica de cada paciente. Com esta metodologia, pudemos associar a atividade de PI3K com dados clínicos e biológicos dos pacientes. Primeiramente, não observamos associação entre o *score* de PI3K e os subtipos moleculares de LLA-T (Figura 4). Mais importante, mostramos que pacientes que apresentaram falha na terapia de indução (>5% blastos leucêmicos em aspirado de medula óssea após 4 semanas de terapia de indução) ou recaída parecem apresentar maior atividade da via PI3K (Figure 2). Este dado pode ser considerado como preliminar devido ao reduzido número de casos de LLA-T analisados, sendo necessária validação com maior número de pacientes tratados segundo o protocolo GBTLI LLA-99, bem como pacientes de outros protocolos. De qualquer forma, a associação entre o *score* de PI3K e o prognóstico dos pacientes

corrobora estudo anterior de nosso grupo, no qual se observou que pacientes com mutações bialélicas de PTEN possuem menor taxa de sobrevida do que pacientes com mutações monoalélicas.<sup>70</sup> Em conjunto, fornecemos evidência de que o nível de ativação da via PI3K pode influenciar a resistência ao tratamento na LLA-T.

Os dados de expressão gênica global mostraram que inibição de PI3K reprimiu múltiplos genes e vias associados a crescimento celular, incluindo metabolismo energético, transcrição e biossíntese de diversos compostos e estruturas celulares. Vários conjuntos gênicos compostos por alvos do fator de transcrição Myc<sup>83-85</sup> foram reprimidos pelo inibidor de PI3K tanto em linhagens como em células primárias de LLA-T. Ainda, observamos queda nos níveis da proteína Myc em linhagem de LLA-T perante inibição da via (Figure 1). Evidências sugerem que a oncoproteína Myc é um importante efetor dos efeitos pró-proliferação da sinalização por Notch1 tanto em timócitos normais<sup>7,39</sup> como durante a oncogênese leucêmica.<sup>39,97</sup>

As vias PI3K e Notch1 estão interconectadas na LLA-T. Primeiro, Notch1 regula indiretamente a via PI3K. Notch1 induz a expressão de *HES1*,<sup>40</sup> um regulador negativo da expressão de *PTEN*. Nossa grupo identificou que células primárias de LLA-T com mutações de ganho de função em *NOTCH1* possuem menor expressão de *PTEN*, bem como maior expressão de Myc.<sup>67</sup> Ainda, inibição de Notch1 com GSIs causa aumento dos níveis proteicos de *PTEN* e inibição da fosforilação de Akt.<sup>66</sup> Segundo, foi previamente sugerido que mutações ou deleções de *PTEN* induzem resistência à inibição de Notch1 com GSIs.<sup>66</sup> Este dado indicaria uma transferência da dependência da célula leucêmica na sinalização de Notch1 pela sinalização de PI3K, fornecendo um argumento para a inibição simultânea de ambas as vias de sinalização como estratégia terapêutica na LLA-T.<sup>124</sup> Outro grupo, no entanto, forneceu evidências de que as vias possuem um aspecto cooperativo. Um modelo leucêmico em camundongos mostrou que células negativas para *PTEN*, ao contrário do esperado, permaneciam dependentes de sinalização por Notch1. Ainda, células primárias de pacientes de LLA-T previamente expandidas como xenógrafos em camundongos

NOD/SCID não mostraram correlação entre perda de *PTEN* e sensibilidade a GSIs.<sup>98</sup> Nossos dados indicam Myc como um dos efetores de PI3K em células de LLA-T, colocando este fator de transcrição como um importante ponto de convergência entre as vias Notch1 e PI3K (Figure 6). Em linhagens celulares sensíveis a GSIs, superexpressão ectópica de Myc resgata o crescimento celular inibido perante inibição de Notch1.<sup>39</sup> Ainda, Myc foi identificado como hiperexpresso em células iniciadoras de leucemia,<sup>87</sup> identificadas como resistentes a glucocorticoides.<sup>125</sup> Em conjunto, estes dados indicam que Myc possa se caracterizar como um possível alvo para intervenção terapêutica na LLA-T. Foi recentemente descrito que inibidores de bromodomínios BET atuam na proteína *bromodomain-containing protein 4* (BRD4), um ativador transcrecional de *MYC*.<sup>99,126–128</sup> Uma dessas moléculas, JQ1, além de ser capaz de efetivamente inibir a expressão e função de Myc, inibiu o crescimento celular de células de mieloma múltiplo,<sup>127</sup> leucemia mieloide aguda<sup>128</sup> e LLA-B<sup>100</sup> e T.<sup>87</sup>

Regulação negativa de Myc perante tratamento com glucocorticoides é um processo essencial para a indução de apoptose em linhagem celular de LLA-T.<sup>129,130</sup> Ainda, a resistência a glucocorticoides foi previamente associada a um fenótipo proliferativo caracterizado pela ativação de PI3K e Myc, indução da glicólise e fosforilação oxidativa, biossíntese de colesterol e metabolismo do glutamato. Este dado indica que a ativação de vias bioenergéticas requeridas para a proliferação celular podem suprimir o potencial apoptótico e evitar a crise metabólica iniciada pela sinalização por receptores de glucocorticoides.<sup>88,103</sup> De fato, linhagens celulares de LLA-T mais proliferativas são mais resistentes a prednisolona e dexametasona.<sup>88</sup> Glucocorticoides possuem um papel de grande importância em protocolos de tratamento contemporâneos de LLA. Resposta inicial à pré-fase de tratamento com 7 dias de glucocorticoides acompanhada de uma injeção intratecal de metotrexato se caracteriza como um fator prognóstico importante em LLA pediátrica.<sup>101</sup> Resistência a glucocorticoides é também uma característica bem documentada das células leucêmicas após a recaída.<sup>64,102</sup> Nossos dados de expressão gênica global mostraram que inibição de PI3K acarreta em repressão de múltiplas vias associadas a crescimento celular e

biossíntese de compostos, potencialmente afetando o fenótipo proliferativo das células leucêmicas e as sensibilizando a glucocorticoides. Através de análise de ciclo celular mostramos que o inibidor de PI3K AS605240 induz parada do ciclo celular em G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (Figure 5b). Ainda, quantificação do índice de combinação entre AS605240 e prednisolona mostrou sinergismo em 5 de 6 linhagens celulares de LLA-T testadas. Notavelmente, para a linhagens P12-ICHIKAWA, o valor de índice combinação encontrado caracteriza sinergismo muito forte (Figure 4a; Table 1).<sup>77</sup> Este dados corroboram estudos anteriores, nos quais foi observada uma interação sinérgica entre o inibidor de mTOR rapamicina (sirolimus) e dexametasona em células de LLA-T.<sup>63,104</sup> Ainda, foi descrito que o inibidor de PI3K LY294002 foi capaz de sensibilizar células de LLA com rearranjos MLL a prednisolona *in vitro*.<sup>105</sup> É importante ressaltar que, neste estudo, linhagens de LLA-T intrinsecamente mais resistentes à prednisolona apresentaram sinergismo mais fraco em comparação a linhagens mais sensíveis à droga (Figure 4a-b). Este dado sugere que o tratamento com o inibidor de PI3k não é capaz de quebrar a resistência de células de LLA-T a glucocorticóides, mas apenas de sensibilizá-las aos efeitos dessas drogas. Sob esta perspectiva, a via da PI3K não seria a única responsável pelo fenótipo resistente a glucocorticoides.<sup>131</sup> O modelo de *oncogene addiction* se baseia no conceito de que, apesar das miríade de lesões genéticas presentes em células cancerosas, alguns tumores dependem de apenas um oncogene dominante para seu crescimento e sobrevivência, de forma que a inibição deste oncogene específico seria suficiente para bloquear o fenótipo neoplásico.<sup>132</sup> Nossos resultados, consequentemente, indicam que o conceito de *oncogene addiction* não se aplicaria à via da PI3K na LLA-T.

Por fim, pudemos mostrar que o AS605240 apresentou sinergismo com dexametasona em um modelo de LLA-T xenográfico em camundongos NOD/SCID (Figure 4c). Neste experimento, a sobrevida de camundongos tratados com ambas as drogas foi significativamente maior que daqueles tratados apenas com AS605240, dexametasona ou veículo. Notavelmente, não observamos diferença no que diz respeito ao efeito do inibidor de PI3K entre camundongos transplantados com células mutantes ou selvagens para *PTEN*. Este dado está de

acordo com nossas observações de que o IC<sub>50</sub> de AS605254 em linhagens de LLA-T não está associado à presença de mutações em PTEN e que pacientes mutantes para este gene não se agruparam entre aqueles com maior score de atividade de PI3K. Desta forma, oferecemos evidências de que pacientes de LLA-T podem ser potencialmente beneficiados por inibidores de PI3K independentemente da presença ou não de mutações ou deleções de PTEN.

Em contraste com a interação sinérgica de AS605240 com glucocorticoides, o inibidor de PI3K apresentou antagonismo com MTX e DNR em quase todas as linhagens celulares testadas (Figure 5a; Table 1). MTX inibe de maneira alostérica a enzima *dihydrofolate reductase* (DHFR), que participa na síntese do tetraidrofolato, uma molécula essencial para a biossíntese de purinas, timidilato e diversos aminoácidos.<sup>91</sup> O mecanismo de ação do MTX em células tumorais se baseia na limitação do suprimento de dTTP e purinas, levando a danos durante a reparação do DNA, quebras de dupla-fita no DNA e apoptose. O acúmulo de quebras no DNA induzidas por MTX é mínimo em células tumorais não proliferativas, o que pode ser explicado pela menor taxa de lesões no DNA que necessitam de reparo e, mais importante, pela menor necessidade de nucleotídeos na ausência de replicação do DNA.<sup>92</sup> O antracíclico DNR estabiliza os complexos covalentemente ligados da enzima topoisomerase II com moléculas de DNA. O processamento destes complexos pela célula resulta em quebras na molécula de DNA, que por sua vez ativam vias de sinalização associadas a stress, parada do ciclo celular e apoptose. Antracíclicos são especialmente tóxicos durante a fase S do ciclo celular, quando a replicação do DNA e transcrição gênica estão ambas ocorrendo.<sup>109</sup> AS605240 induziu parada do ciclo celular em G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> em linhagens de LLA-T, com consequente diminuição da porcentagem de células na fase S do ciclo mais sensíveis a MTX e DNR. Este efeito seria responsável pela interação antagonista entre o inibidor de PI3K com MTX e DNR. Apesar de observarmos que o inibidor de PI3K resultou em proteção completa da parada do ciclo celular em S induzida por MTX, tratamento com AS605240 não bloqueou a entrada em S completamente. Esta observação sugere que um segundo mecanismo poderia estar envolvido na tolerância ao MTX perante inibição de

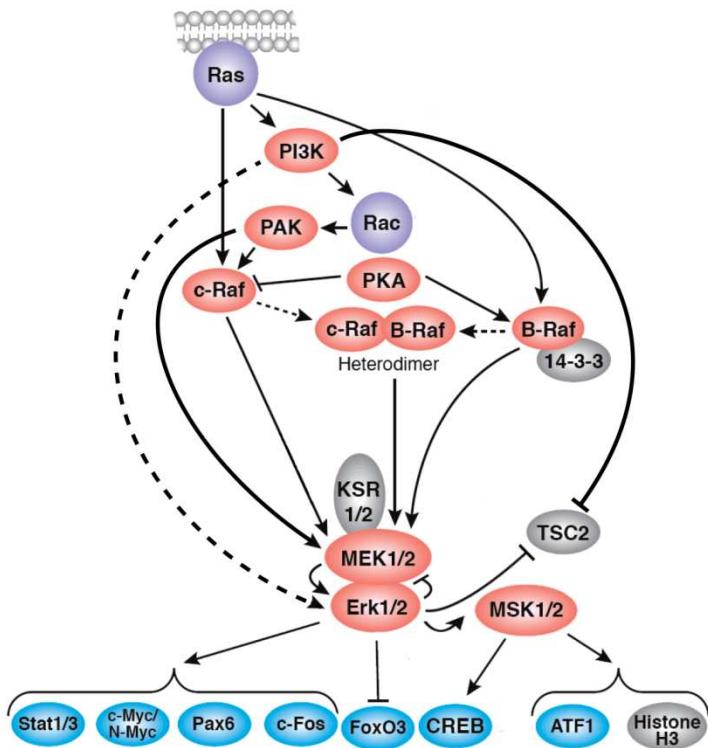
PI3K. Análise de incorporação de BrdU mostrou que tratamento com AS605240 reduziu a taxa de incorporação de nucleotídeos durante a replicação do DNA (Figure 5c). Desta maneira, oferecemos evidência de que o efeito citostático combinado à queda na velocidade de replicação de DNA durante a divisão celular são responsáveis pelo efeito protetor de inibidores de PI3K a drogas que atuam prioritariamente durante a divisão celular.

O sucesso dos atuais protocolos de tratamento de LLA se baseia, em parte, na combinação de múltiplos agentes antineoplásicos ao longo das diversas fases de terapia.<sup>6,11,12</sup> Desta maneira, procuramos explorar diferentes esquemas de administração de AS605240 em combinação com MTX e DNR, visando identificar potenciais janelas para a introdução de inibidores de PI3K nos protocolos de tratamento de LLA modernos. Em contraste com a interação antagonista entre AS605240 e DNR ou MTX, quando as drogas foram administradas simultaneamente às culturas, observamos uma interação sinérgica ou aditiva quando MTX (5 das 7 linhagens testadas) ou DNR (2 de 3 linhagens) foram adicionados 48h antes que AS605240 (Figure 5d; Table 1). Este dado indica a necessidade de um intervalo mínimo de tempo para que as drogas MTX e DNR atuem nas células leucêmicas antes da adição do inibidor de PI3K. Notavelmente, linhagens resistentes a MTX após 48 de tratamento foram aquelas que apresentaram menores índices de combinação com AS605240, indicando que inibição de PI3K é mais efetiva em sensibilizar células de LLA-T mais resistentes ao MTX (Figure 5d-e).

Artigo publicado recentemente mostrou que genes significativamente correlacionados com resistência a glucocorticoides em LLA-T estão inversamente correlacionados com resistência a MTX, sugerindo que as redes transpcionais que suportam o fenótipo de resistência a uma determinada droga possa sensibilizar a células leucêmica à outra droga.<sup>110</sup> Nossos dados mostram uma interação sinérgica do inibidor de PI3K com glucocorticoides e antagonista com MTX, corroborando esta hipótese. Ainda, observamos que AS605240 reprimiu múltiplos conjuntos gênicos associados à tradução, processo sugerido como

central no controle do balanço entre sensibilidade a glucocorticoides e sensibilidade a MTX em células de LLA-T.<sup>110</sup> Desta maneira, sugerimos que o perfil transcrecional que regula a resposta a glucocorticoides e MTX está potencialmente sob controle da via PI3K.

PI3K foi descrita como reguladora chave da ativação de cascatas de sinalização de *mitogen activated proteins* (MAP) quinases (Figura 10),<sup>113,114</sup> que compreendem módulos de sinalização membrana-núcleo envolvidas em múltiplos processos fisiológicos. Entre as diferentes MAP quinases identificadas, destaca-se o módulo Raf/Mek/Erk, ativado por sinais extracelulares mitogênicos ou de diferenciação. Proteínas da família Raf funcionam como *MAP kinase kinases kinases* (MAPKKKs), fosforilando e ativando *MAP kinase kinases* (MAPKKs) chamadas de Mek. Estas, por sua vez, fosforilam e ativam *MAP kinase* (MAPKs) chamadas de Erk. Uma vez ativadas, proteínas Erk são translocadas para o núcleo, onde irão fosforilar e regular a atividade de fatores de transcrição associados com entrada no ciclo celular, diferenciação celular e regulação gênica induzida por fatores de crescimento.<sup>133</sup> PI3K é capaz de ativar a via Ras/Raf/Mek/Erk de maneiras tanto Raf dependente<sup>113</sup> como independente.<sup>114</sup> Ainda, utilizando *zebrafish* como um modelo, foi mostrado que PI3K possui um papel durante a hematopoese e angiogênese através da sinalização por Ras,<sup>134</sup> uma GTPase de membrana frequentemente mutada em diversos tipos de câncer.<sup>135</sup> Em contraste, evidências crescentes indicam que a inibição farmacológica da via PI3K aciona ativação compensatória de sinalização por Erk, capaz de contrabalançar a atividade antitumoral do inibidor de PI3K.<sup>136-138</sup> Sob esta perspectiva, procuramos definir o perfil de ativação da via em resposta à inibição de PI3K em células de LLA-T (Figura 10).



**Figura 10. Interação entre vias de sinalização PI3K e Ras/Raf/Mek/Erk.** PI3K regula a via de sinalização Ras/Raf/Mek/Erk, levando à ativação de múltiplos fatores de transcrição, como Myc, CREB1 e ATF1.

Análises de *western blotting* mostraram redução da forma fosforilada de Erk1/2 perante inibição de PI3K com AS605240. No entanto, a atividade de Erk foi reestabelecida após 3h de incubação, momento no qual a fosforilação de Akt, um dos principais efetores da via PI3K, foi mínima. Com o objetivo de melhor definir o mecanismo compensatório que levou à ativação de Erk1/2, procedemos com a análise dos níveis de fosforilação de componentes da via Raf/Mek/Erk. Ao contrário de muitas quinases nas quais a fosforilação em um único sítio na região catalítica leva à ativação da enzima, c-Raf contém muitos sítios regulatórios por fosforilação, incluindo serinas (43, 233, 259, 338, 339, 491 e 621), treoninas (494) e tirosinas (340 e 341).<sup>139</sup> Nós pudemos analisar o nível de fosforilação de duas serinas de c-Raf, 259 e 338, bem como os níveis de p-Mek1/2. Apesar de controverso,<sup>140</sup> um papel de PI3K na regulação de c-Raf através de fosforilação da Ser338 foi descrito.<sup>141,142</sup> A fosforilação da Ser338 de c-Raf diminui a ligação de

seu domínio regulatório ao seu domínio catalítico, ativando-a.<sup>115</sup> Já a Ser259 do domínio regulatório de c-Raf foi descrita como alvo da atividade de quinase de Akt. A fosforilação da Ser259 acarreta em ligação da proteína 14-3-3, um regulador negativo de c-Raf.<sup>116</sup> Nossas análises mostraram que os perfis de fosforilação de Mek1/2 e Ser259 de c-Raf não foram consistentemente alterados pela inibição de PI3K e que o perfil de fosforilação da Ser 228 de c-Raf não acompanha temporalmente o perfil observado para fosforilação de Erk1/2. Deste modo, oferecemos indícios de que o mecanismo de *feedback* que levou à ativação de Erk1/2 seja dependente de outra(s) quinases.

O fator de transcrição CREB1 foi descrito como um mediador da sinalização por Erk<sup>118</sup> e alvo de Akt.<sup>143</sup> Ainda, um papel de CREB1 no processo de oncogênese foi sugerido devido à sua hiperexpressão na maioria das células leucêmicas de pacientes de LLA, nos níveis tanto transcrecional como proteíco.<sup>144–</sup>

<sup>146</sup> CREB1 e fatores de transcrição bZIP relacionados, CREM e ATF1, se ligam a regiões do genoma chamadas de *cAMP-response elements* (CREs), encontradas em promotores de múltiplos genes associados a metabolismo, proliferação, apoptose e diferenciação.<sup>147</sup> Os genes *CREB1* e *CREM* produzem múltiplas isoformas por *splicing* alternativo, gerando produtos proteicos que podem atuar tanto ativando como inibindo a transcrição de genes alvo.<sup>148</sup> Ainda, as proteínas CREB1 e CREM podem formar homo ou heterodímeros entre si ou com ATF1.<sup>149</sup> Apesar da complexidade do modelo analisado, a indução de expressão de alvos de CREB1 por AS605240 (Figura 6) indica maior atividade transcrecional desta família de fatores de transcrição perante inibição da via PI3K, um efeito que pode representar uma resposta de *feedback* à privação de sinalização oncogênica por PI3K. Resta saber se a ativação de CREB1 perante inibição de PI3K é Erk1/2 dependente.

Apesar do fato de que todas as linhagens celulares e células primárias cultivadas *in vitro* foram sensíveis a AS605240 (Supplementary Figure 5), este inibidor de PI3K não foi capaz de prevenir a progressão leucêmica como droga única em modelo xenográfico de LLA-T em camundongos NOD/SCID. Diversas

evidências indicam que inibição farmacológica de PI3K leva à ativação compensatória de sinalização por Erk, capaz de contrabalançar a atividade antitumoral do inibidor de PI3K.<sup>136–138</sup> Estudos adicionais serão necessários para definir se a ativação compensatória de Erk1/2 e CREB1 também ocorre no modelo *in vivo*, bem como se este efeito pode estar relacionado à resistência à inibição de PI3K e outros quimioterápicos.

Perante ativação, CREB1 se liga a sítios CRE, definidos pela sequência TGACGTCA, ou a sítios CRE parciais, com sequência CGTCA/TGACG. Praticamente todos os genes de histonas dependentes de replicação possuem sítios CRE parciais próximos às regiões TATA de seus promotores.<sup>117</sup> Ainda, foi previamente descrito que CREB1 regula positivamente a expressão de histonas em células leucêmicas.<sup>117</sup> Os níveis de RNAm de histonas aumentam até 35 vezes durante a fase S do ciclo celular em comparação à fase G<sub>1</sub>.<sup>150</sup> Os promotores destes genes em geral contêm elementos consenso que ligam a atividade do promotor com o ciclo celular.<sup>151</sup> Neste contexto, é intrigante o aumento da expressão de genes de histonas dependentes de replicação perante tratamento com AS605240 (Figuras 8-9), que induz parada no ciclo celular em G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. Este aumento de expressão foi observado inclusive para os microarranjos utilizados para a análise de expressão global de linhagens, baseados em sondas na porção 3' dos transcritos (HG-U133 Plus 2.0 arrays). O protocolo para obtenção de cRNA marcado para hibridização no microarranjo seleciona apenas moléculas de RNAm poliadeniladas, excluindo RNA ribossômico ou mesmo RNAm de histonas não poliadenilados. O RNAm de histonas dependentes de replicação geralmente não possuem a cauda poli-A, mas uma estrutura em *stem-loop* contendo 16 nucleotídeos altamente conservados e um *histone downstream element* (HDE), reconhecidos pela *stem-loop binding protein* (SLBP) e *U7 small nuclear RNAs* (U7 snRNPs), respectivamente.<sup>151</sup> Além de facilitar o processamento 3' do RNAm de histonas, a proteína SLBP também facilita o transporte para o citoplasma e degradação no final da fase S do ciclo celular. Em alguns casos, histonas não dependentes de replicação, como as variantes H3.3 e

H2A.X, são expressas ao longo de todo o ciclo celular e possuem cauda poli-A na extremidade 3' do RNAm.<sup>152</sup>

Perda de componentes da maquinaria de processamento 3' de RNAm de histonas, incluindo a proteína SLBP, resulta em produção elevada de transcritos poliadenilados de histonas dependentes de replicação<sup>120</sup>. Ainda, os níveis de RNAm poliadenilados de histonas pode aumentar em condições celulares específicas, como parada do ciclo celular em G<sub>1</sub> por acúmulo de p53,<sup>121</sup> diferenciação<sup>153</sup>, tumorigênese<sup>154</sup> e tratamento com agentes químicos ou radiação ionizante.<sup>119,121</sup> Estes transcritos poliadenilados são transportados para o citoplasma e se ligam a complexos polirribossômicos, possivelmente produzindo produtos proteicos funcionais.<sup>119</sup> Transcritos poliadenilados de histonas são também encontrados em *Caenorhabditis elegans*,<sup>155</sup> sugerindo um aspecto funcional importante no controle de expressão de histonas durante a evolução. Nossos dados indicam aumento da expressão de RNAm poliadenilados de histonas dependentes de replicação em linhagens e células primárias de LLA-T (Figura 9b). Ainda, este efeito foi máximo com menores tempos de incubação com a droga, indicando um mecanismo de regulação independente à parada do ciclo celular em G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> induzida pela inibição da PI3K. Neste contexto, a ativação de sinalização por CREB1 perante tratamento com AS605240 parece oferecer um possível mecanismo para o efeito observado. Apesar do fato de que a importância funcional destes transcritos permanece ainda incerta, foi previamente descrito que transcritos poliadenilados de histonas possuem uma meia-vida maior que os transcritos com estrutura *stem-loop*.<sup>156</sup> Desta maneira, é possível que a expressão elevada destas moléculas seja requerida para compensar a queda na síntese de histonas nas células não proliferativas.

AS605240 foi previamente descrito como um inibidor de PI3K com maior especificidade à isoforma γ de PI3K, predominantemente expressa no sistema hematopoético.<sup>52</sup> Desta maneira, tratamento de LLA-T com um inibidor específico desta isoforma poderia oferecer uma alternativa terapêutica com menores efeitos colaterais. No entanto, não observamos efeito citotóxico de AS605240 em

concentrações que afetaria apenas a sinalização por PI3K (0.1-0.2  $\mu$ M).<sup>73</sup> O IC<sub>50</sub> de AS605240 em linhagens de LLA-T foi próximo de 20  $\mu$ M (Supplementary Figure 5), concentração na qual o acúmulo de p-Akt foi inibido em cerca de 70% (Figure 1b), provavelmente afetando múltiplas isoformas de PI3K. Este dado, aliado ao fato de que mutações em PI3K $\alpha$ , apesar de raras, são encontradas em amostras de LLA-T e que evidência crescente aponta para o papel das isoformas  $\gamma$  e  $\delta$  de PI3K na oncogênese leucêmica,<sup>69,96</sup> indica a importância de múltiplas isoformas de PI3K na LLA-T. Sugerimos que o uso de inibidores de PI3K que atuem em múltiplas isoformas da enzima possam oferecer vantagens para o tratamento de pacientes de LLA-T em comparação a inibidores isoforma-específicos.

AS605240 mostrou seletividade por células leucêmicas em comparação a timócitos humanos normais e foi capaz de inibir a progressão leucêmica em camundongos NOD/SCID transplantados com células primárias de LLA-T. Ainda, assim como previamente descrito,<sup>74</sup> o inibidor pode ser utilizado em camundongos em doses diárias de 30 mg/Kg sem causar toxicidade generalizada (Figure 1f-g). Camundongos NOD/SCID com leucemia xenográfica tratados com AS605240 por 1 mês apresentaram perda de peso em níveis similares a animais tratados com dexametasona, indicando que a droga foi bem tolerada pelos animais (Supplementary Figure 7). A inibição da isoforma  $\alpha$  de PI3K foi previamente associada ao bloqueio da internalização de glicose mediada por insulina em adipócitos, oferecendo um possível mecanismo para a perda de peso observada.<sup>157</sup>

Observamos que o tratamento de camundongos com AS605240, mesmo em doses únicas, resultou em mobilidade dificultada em apenas 40s após uma injeção peritoneal. Após cerca de 1,5 min da administração da droga, os animais mantiveram-se imóveis por diversos minutos (Supplementary Video). Estes dados indicam potenciais efeitos colaterais no sistema nervoso dos animais. Desta forma, se tornam necessários experimentos adicionais para testar a capacidade de AS605240 em atravessar a membrana hematoencefálica e seus potenciais efeitos neurotóxicos.

Em resumo, nossos dados de expressão gênica indicam que atividade de PI3K está associada à resistência à quimioterapia e pior prognóstico na LLA-T. Corroborando este dado, inibição de PI3K sensibilizou células de LLA-T a glucocorticoides *in vitro* e em um modelo xenográfico de LLA-T em camundongos NOD/SCID. Ainda, mostramos que inibição de PI3K pode sensibilizar as células leucêmicas a MTX e DNR se utilizado de um esquema temporal específico de administração das drogas. Este dado reforça a necessidade de identificação de janelas específicas nos protocolos de tratamento modernos de LLA nas quais a introdução de inibidores de PI3K possa ser viável.

## 5. CONCLUSÕES

- i. Pacientes de LLA-T com pior prognóstico apresentaram maior atividade de PI3K, segundo score de atividade da via baseado em dados de expressão gênica global.
- ii. Inibição de PI3K com AS605240 diminuiu o acúmulo de Myc, acarretando em queda na expressão de múltiplos alvos deste fator de transcrição. Nossos dados indicam Myc como um importante ponto de convergência entre as vias de sinalização Notch1 e PI3K na LLA-T.
- iii. Dados de expressão gênica global tanto em linhagens como em células primárias de LLA-T mostraram que atividade da via PI3K está potencialmente associada à resistência a glucocorticoides.
- iv. Corroborando os dados de expressão gênica, AS605240 sensibilizou células de LLA-T a glucocorticoides *in vitro* e em modelo de LLA-T xenográfico em camundongos NOD/SCID.
- v. Células mais resistentes ao glucocorticoide prednisolona apresentaram menor sinergismo entre esta droga e AS605240 *in vitro*, sugerindo que a via PI3K não é a única responsável pelo fenótipo resistente da LLA-T a glucocorticoides.
- vi. O sinergismo entre AS605240 e glucocorticoides tanto para células *PTEN* mutadas como selvagens indica que pacientes de LLA-T podem ser potencialmente beneficiados por inibidores de PI3K independentemente da presença ou não de mutações ou deleções de *PTEN*.
- vii. Foi observada uma interação antagonista de AS605240 com MTX e DNR, que pôde ser revertida com a adição destas drogas 48h antes inibidor de PI3K. Este dado evidencia a importância do esquema temporal de administração das drogas ao se considerar a introdução de inibidores de PI3K em protocolos de tratamento de LLA-T.

viii. O efeito protetor do inibidor de PI3K a drogas que atuam prioritariamente durante a divisão celular parece ser resultado do efeito citostático combinado à queda na velocidade de replicação de DNA durante a divisão celular induzidos pela inibição da via.

ix. Notavelmente, AS605240 foi mais efetivo em sensibilizar células de LLA-T mais resistentes ao MTX.

x. Tratamento com AS605240 acarretou em inibição de Erk1/2. No entanto, a partir de 3h de tratamento a sinalização por Erk1/2 foi reestabelecida, indicando um mecanismo de *feedback* regulando a atividade da via. Este mecanismo parece ser independente de Raf e Mek1/2.

xi. Inibição de PI3K regulou a fosforilação de múltiplas isoformas da família de fatores de transcrição CREB1/CREM/ATF1, acarretando em indução da expressão de alvos de CREB1. Este efeito pode representar parte da resposta de *feedback* à privação de sinalização oncogênica por PI3K.

xii. AS605240 não mostrou efeito citotóxico em células de LLA-T em concentrações capazes de inibir apenas sinalização pela isoforma  $\gamma$ , indicando que em termos terapêuticos é importante a inibição de múltiplas isoformas de PI3K.

xiii. AS605240 mostrou seletividade por células leucêmicas em comparação a timócitos humanos normais e foi capaz de inibir a progressão leucêmica em camundongos NOD/SCID transplantados com células primárias de LLA-T, indicando um potencial uso clínico da droga no tratamento de LLA-T.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pui C-H, Robison LL & Look a T. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 2008; **371**: 1030–43.
2. Pui CH, Behm FG & Crist WM. Clinical and biologic relevance of immunologic marker studies in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1993; **82**: 343–62.
3. Wang JCY & Dick JE. Cancer stem cells: lessons from leukemia. *Trends Cell Biol.* 2005; **15**: 494–501.
4. Mullighan CG. The molecular genetic makeup of acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 2012; **2012**: 389–96.
5. Pui C, Relling M V & Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2004; **350**: 1535–48.
6. Pui CH & Evans WE. Acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 1998; **339**: 605–15.
7. Armstrong S a & Look a T. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2005; **23**: 6306–15.
8. Ferrando A a, Neuberg DS, Staunton J, Loh ML, Huard C, Raimondi SC et al. Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* 2002; **1**: 75–87.
9. Pui CH, Campana D & Evans WE. Childhood acute lymphoblastic leukaemia--current status and future perspectives. *Lancet Oncol.* 2001; **2**: 597–607.
10. Coustan-Smith E, Mullighan CG, Onciu M, Behm FG, Raimondi SC, Pei D et al. Early T-cell precursor leukaemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol.* 2009; **10**: 147–56.
11. Pui C & Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2006; **354**: 166–78.
12. Pui C-H, Cheng C, Leung W, Rai SN, Rivera GK, Sandlund JT et al. Extended follow-up of long-term survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2003; **349**: 640–9.
13. Silverman LB, Gelber RD, Dalton VK, Asselin BL, Barr RD, Clavell L a et al. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber Consortium Protocol 91-01. *Blood* 2001; **97**: 1211–8.
14. Schrappe M, Reiter A, Ludwig WD, Harbott J, Zimmermann M, Hiddemann W et al. Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90. German-Austrian-Swiss ALL-BFM Study Group. *Blood* 2000; **95**: 3310–22.

15. Reiter a, Schrappe M, Ludwig WD, Hiddemann W, Sauter S, Henze G *et al.* Chemotherapy in 998 unselected childhood acute lymphoblastic leukemia patients. Results and conclusions of the multicenter trial ALL-BFM 86. *Blood* 1994; **84**: 3122–33.
16. Lange BJ, Bostrom BC, Cherlow JM, Sensel MG, La MKL, Rackoff W *et al.* Double-delayed intensification improves event-free survival for children with intermediate-risk acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Cancer Group. *Blood* 2002; **99**: 825–33.
17. Bostrom BC, Sensel MR, Sather HN, Gaynon PS, La MK, Johnston K *et al.* Dexamethasone versus prednisone and daily oral versus weekly intravenous mercaptopurine for patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Cancer Group. *Blood* 2003; **101**: 3809–17.
18. Hutchinson RJ, Gaynon PS, Sather H, Bertolone SJ, Cooper H a, Tannous R *et al.* Intensification of therapy for children with lower-risk acute lymphoblastic leukemia: long-term follow-up of patients treated on Children's Cancer Group Trial 1881. *J. Clin. Oncol.* 2003; **21**: 1790–7.
19. Pui C-H. Central nervous system disease in acute lymphoblastic leukemia: prophylaxis and treatment. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 2006; 142–6.  
doi:10.1182/asheducation-2006.1.142
20. Pullen J, Boyett J, Shuster J, Crist W, Land V, Frankel L *et al.* Extended triple intrathecal chemotherapy trial for prevention of CNS relapse in good-risk and poor-risk patients with B-progenitor acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. *J. Clin. Oncol.* 1993; **11**: 839–49.
21. Weinstein IB & Joe AK. Mechanisms of disease: Oncogene addiction--a rationale for molecular targeting in cancer therapy. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 2006; **3**: 448–57.
22. Zaza G, Cheok M, Yang W, Panetta JC, Pui C-H, Relling M V *et al.* Gene expression and thioguanine nucleotide disposition in acute lymphoblastic leukemia after in vivo mercaptopurine treatment. *Blood* 2005; **106**: 1778–85.
23. Holleman A, Cheok MH, den Boer ML, Yang W, Veerman AJP, Kazemier KM *et al.* Gene-expression patterns in drug-resistant acute lymphoblastic leukemia cells and response to treatment. *N. Engl. J. Med.* 2004; **351**: 533–42.
24. Lughart S, Cheok MH, den Boer ML, Yang W, Holleman A, Cheng C *et al.* Identification of genes associated with chemotherapy crossresistance and treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* 2005; **7**: 375–86.
25. Schmidt S, Rainer J, Riml S, Ploner C, Jesacher S, Achmüller C *et al.* Identification of glucocorticoid-response genes in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2006; **107**: 2061–9.
26. Cario G, Fetz A, Bretscher C, Möricke A, Schrauder A, Stanulla M *et al.* Initial leukemic gene expression profiles of patients with poor in vivo prednisone response are similar to those of blasts persisting under prednisone treatment in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Ann. Hematol.* 2008; **87**: 709–16.

27. Sorich MJ, Pottier N, Pei D, Yang W, Kager L, Stocco G *et al.* In vivo response to methotrexate forecasts outcome of acute lymphoblastic leukemia and has a distinct gene expression profile. *PLoS Med.* 2008; **5**: e83.
28. Thompson JE & Thompson CB. Putting the rap on Akt. *J. Clin. Oncol.* 2004; **22**: 4217–26.
29. Tissing WJE, den Boer ML, Meijerink JPP, Menezes RX, Swagemakers S, van der Spek PJ *et al.* Genomewide identification of prednisolone-responsive genes in acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood* 2007; **109**: 3929–35.
30. Rhein P, Scheid S, Ratei R, Hagemeier C, Seeger K, Kirschner-Schwabe R *et al.* Gene expression shift towards normal B cells, decreased proliferative capacity and distinct surface receptors characterize leukemic blasts persisting during induction therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2007; **21**: 897–905.
31. Fine BM, Kaspers GJL, Ho M, Loonen AH & Boxer LM. A genome-wide view of the in vitro response to l-asparaginase in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res.* 2005; **65**: 291–9.
32. Uckun FM, Gaynon PS, Sensel MG, Nachman J, Trigg ME, Steinherz PG *et al.* 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.* 1997; **15**: 2214–21.
33. Schrappe M, Valsecchi MG, Bartram CR, Schrauder A, Panzer-Grümayer R, Möricke A *et al.* Late MRD response determines relapse risk overall and in subsets of childhood T-cell ALL: results of the AIEOP-BFM-ALL 2000 study. *Blood* 2011; **118**: 2077–84.
34. Conter V, Bartram CR, Valsecchi MG, Schrauder A, Panzer-Grümayer R, Möricke A *et al.* Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study. *Blood* 2010; **115**: 3206–14.
35. Aifantis I, Raetz E & Buonamici S. Molecular pathogenesis of T-cell leukaemia and lymphoma. *Nat. Rev. Immunol.* 2008; **8**: 380–90.
36. Graux C, Cools J, Michaux L, Vandenberghe P & Hagemeijer a. Cytogenetics and molecular genetics of T-cell acute lymphoblastic leukemia: from thymocyte to lymphoblast. *Leukemia* 2006; **20**: 1496–510.
37. Weng AP, Ferrando A a, 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**: 269–71.
38. Grabher C, von Boehmer H & Look a T. Notch 1 activation in the molecular pathogenesis of T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nat. Rev. Cancer* 2006; **6**: 347–59.
39. Sharma VM, Calvo J a, Draheim KM, Cunningham L a, 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**: 8022–31.
40. Wang H, Zou J, Zhao B, Johannsen E, Ashworth T, Wong H *et al.* Genome-wide analysis reveals conserved and divergent features of Notch1/RBPJ binding in human and murine T-lymphoblastic leukemia cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011; **108**: 14908–13.

41. Sanchez-Irizarry C, Carpenter AC, Weng AP, Pear WS, Aster JC & Blacklow SC. Notch subunit heterodimerization and prevention of ligand-independent proteolytic activation depend, respectively, on a novel domain and the LNR repeats. *Mol. Cell. Biol.* 2004; **24**: 9265–73.
42. Gupta-Rossi N, Le Bail O, Gonen H, Brou C, Logeat F, Six E *et al.* Functional interaction between SEL-10, an F-box protein, and the nuclear form of activated Notch1 receptor. *J. Biol. Chem.* 2001; **276**: 34371–8.
43. Van Es JH, van Gijn ME, Riccio O, van den Born M, Vooijs M, Begthel H *et al.* Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature* 2005; **435**: 959–63.
44. Wong GT, Manfra D, Poulet FM, Zhang Q, Josien H, Bara T *et al.* Chronic treatment with the gamma-secretase inhibitor LY-411,575 inhibits beta-amyloid peptide production and alters lymphopoiesis and intestinal cell differentiation. *J. Biol. Chem.* 2004; **279**: 12876–82.
45. Deangelo D, Stone R, Silverman L, Stock W, Attar E, Fearen I *et al.* A phase I clinical trial of the notch inhibitor MK-0752 in patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma (T-ALL) and other leukemias. in *J. Clin. Oncol. 2006 ASCO Annu. Meet. Proc. Part I* 2006 **20**: 6585.
46. Ferrando A a. The role of NOTCH1 signaling in T-ALL. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 2009; 353–61. doi:10.1182/asheducation-2009.1.353
47. 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**: 3762–74.
48. Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 2002; **296**: 1655–7.
49. Neri LM, Cani a, Martelli a M, Simioni C, Junghanss C, Tabellini G *et al.* Targeting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in B-precursor acute lymphoblastic leukemia and its therapeutic potential. *Leukemia* 2013; 1–10. doi:10.1038/leu.2013.226
50. Vanhaesebroeck B, Ali K, Bilancio A, Geering B & Foukas LC. Signalling by PI3K isoforms: insights from gene-targeted mice. *Trends Biochem. Sci.* 2005; **30**: 194–204.
51. Martelli a M, Nyåkern M, Tabellini G, Bortul R, Tazzari PL, Evangelisti C *et al.* Phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway and its therapeutical implications for human acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2006; **20**: 911–28.
52. Fruman D a & Cantley LC. Phosphoinositide 3-kinase in immunological systems. *Semin. Immunol.* 2002; **14**: 7–18.
53. Ji H, Rintelen F, Waltzinger C, Bertschy Meier D, Bilancio A, Pearce W *et al.* Inactivation of PI3Kgamma and PI3Kdelta distorts T-cell development and causes multiple organ inflammation. *Blood* 2007; **110**: 2940–7.
54. Swat W, Montgrain V, Doggett TA, Douangpanya J, Puri K, Vermi W *et al.* Essential role of PI3Kdelta and PI3Kgamma in thymocyte survival. *Blood* 2006; **107**: 2415–22.

55. Webb LMC, Vigorito E, Wymann MP, Hirsch E & Turner M. Cutting edge: T cell development requires the combined activities of the p110gamma and p110delta catalytic isoforms of phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Immunol.* 2005; **175**: 2783–7.
56. Vivanco I & Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2002; **2**: 489–501.
57. McManus EJ & Alessi DR. TSC1-TSC2: a complex tale of PKB-mediated S6K regulation. *Nat. Cell Biol.* 2002; **4**: E214–6.
58. Yu H-G, Ai Y-W, Yu L-L, Zhou X-D, Liu J, Li J-H *et al.* Phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway plays an important role in chemoresistance of gastric cancer cells against etoposide and doxorubicin induced cell death. *Int. J. Cancer* 2008; **122**: 433–43.
59. Schade AE, Powers JJ, Wlodarski MW & Maciejewski JP. Phosphatidylinositol-3-phosphate kinase pathway activation protects leukemic large granular lymphocytes from undergoing homeostatic apoptosis. *Blood* 2006; **107**: 4834–40.
60. Xu Q, Simpson S-E, Scialla TJ, Bagg A & Carroll M. Survival of acute myeloid leukemia cells requires PI3 kinase activation. *Blood* 2003; **102**: 972–80.
61. Tazzari PL, Cappellini a, Ricci F, Evangelisti C, Papa V, Grafone T *et al.* Multidrug resistance-associated protein 1 expression is under the control of the phosphoinositide 3 kinase/Akt signal transduction network in human acute myelogenous leukemia blasts. *Leukemia* 2007; **21**: 427–38.
62. Huang W-C & Hung M-C. Induction of Akt activity by chemotherapy confers acquired resistance. *J. Formos. Med. Assoc.* 2009; **108**: 180–94.
63. Zhang C, Ryu Y-K, Chen TZ, Hall CP, Webster DR & Kang MH. Synergistic activity of rapamycin and dexamethasone in vitro and in vivo in acute lymphoblastic leukemia via cell-cycle arrest and apoptosis. *Leuk. Res.* 2012; **36**: 342–9.
64. Kaspers GJL, Wijnands JJM, Hartmann R, Huismans L, Loonen AH, Stackelberg A *et al.* Immunophenotypic cell lineage and in vitro cellular drug resistance in childhood relapsed acute lymphoblastic leukaemia. *Eur. J. Cancer* 2005; **41**: 1300–3.
65. Silva a, Gírio a, Cebola I, Santos CI, Antunes F & Barata JT. Intracellular reactive oxygen species are essential for PI3K/Akt/mTOR-dependent IL-7-mediated viability of T-cell acute lymphoblastic leukemia cells. *Leukemia* 2011; **25**: 960–7.
66. 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**: 1203–10.
67. Silva A, Jotta PY, Silveira AB, Ribeiro D, Brandalise SR, Yunes JA *et al.* Regulation of PTEN by CK2 and Notch1 in primary T-cell acute lymphoblastic leukemia: rationale for combined use of CK2- and gamma-secretase inhibitors. *Haematologica* 2010; **95**: 674–8.
68. Mavrikakis KJ, Van Der Meulen J, Wolfe AL, Liu X, Mets E, Taghon T *et al.* A cooperative microRNA-tumor suppressor gene network in acute T-cell lymphoblastic leukemia (T-ALL). *Nat. Genet.* 2011; **43**: 673–8.

69. 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**: 647–50.
70. Jotta PY, Ganazza M a, Silva A, Viana MB, da Silva MJ, Zambaldi LJG et al. Negative prognostic impact of PTEN mutation in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2010; **24**: 239–42.
71. Ng SS, Tsao MS, Nicklee T & Hedley DW. Wortmannin inhibits pkb/akt phosphorylation and promotes gemcitabine antitumor activity in orthotopic human pancreatic cancer xenografts in immunodeficient mice. *Clin. Cancer Res.* 2001; **7**: 3269–75.
72. Hu L, Zaloudek C, Mills GB, Gray J & Jaffe RB. In vivo and in vitro ovarian carcinoma growth inhibition by a phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor (LY294002). *Clin. Cancer Res.* 2000; **6**: 880–6.
73. Camps M, Rückle T, Ji H, Ardissonne V, Rintelen F, Shaw J et al. Blockade of PI3Kgamma suppresses joint inflammation and damage in mouse models of rheumatoid arthritis. *Nat. Med.* 2005; **11**: 936–43.
74. Barber DF, Bartolomé A, Hernandez C, Flores JM, Redondo C, Fernandez-Arias C et al. PI3Kgamma inhibition blocks glomerulonephritis and extends lifespan in a mouse model of systemic lupus. *Nat. Med.* 2005; **11**: 933–5.
75. Brandalise SR, Pinheiro VR, Aguiar SS, Matsuda EI, Otubo R, Yunes J a et al. Benefits of the intermittent use of 6-mercaptopurine and methotrexate in maintenance treatment for low-risk acute lymphoblastic leukemia in children: randomized trial from the Brazilian Childhood Cooperative Group--protocol ALL-99. *J. Clin. Oncol.* 2010; **28**: 1911–8.
76. Zenatti PP, Ribeiro D, Li W, Zuurbier L, Silva MC, Paganin M et al. Oncogenic IL7R gain-of-function mutations in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Genet.* 2011; **43**: 932–9.
77. Chou T. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol. Rev.* 2006; **58**: 621–681.
78. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005; **102**: 15545–50.
79. Lamb J. The Connectivity Map: a new tool for biomedical research. *Nat. Rev. Cancer* 2007; **7**: 54–60.
80. De Keersmaecker K, Atak ZK, Li N, Vicente C, Patchett S, Girardi T et al. Exome sequencing identifies mutation in CNOT3 and ribosomal genes RPL5 and RPL10 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Genet.* 2013; **45**: 186–90.
81. Scupoli MT, Perbellini O, Krampera M, Vinante F, Cioffi F & Pizzolo G. Interleukin 7 requirement for survival of T-cell acute lymphoblastic leukemia and human thymocytes on bone marrow stroma. *Haematologica* 2007; **92**: 264–6.
82. Rots MG, Pieters R, Kaspers GJ, van Zantwijk CH, Noordhuis P, Mauritz R et al. Differential methotrexate resistance in childhood T- versus common/preB-acute lymphoblastic leukemia

- can be measured by an *in situ* thymidylate synthase inhibition assay, but not by the MTT assay. *Blood* 1999; **93**: 1067–74.
83. Menssen A & Hermeking H. Characterization of the c-MYC-regulated transcriptome by SAGE: identification and analysis of c-MYC target genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002; **99**: 6274–9.
  84. Zeller KI, Jegga AG, Aronow BJ, O'Donnell KA & Dang C V. An integrated database of genes responsive to the Myc oncogenic transcription factor: identification of direct genomic targets. *Genome Biol.* 2003; **4**: R69.
  85. Schuhmacher M, Kohlhuber F, Hözel M, Kaiser C, Burtscher H, Jarsch M et al. The transcriptional program of a human B cell line in response to Myc. *Nucleic Acids Res.* 2001; **29**: 397–406.
  86. Lee L a & Dang C V. Myc target transcriptomes. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2006; **302**: 145–67.
  87. King B, Trimarchi T, Reavie L, Xu L, Mullenders J, Ntziachristos P et al. The ubiquitin ligase FBXW7 modulates leukemia-initiating cell activity by regulating MYC stability. *Cell* 2013; **153**: 1552–66.
  88. Beesley a H, Firth MJ, Ford J, Weller RE, Freitas JR, Perera KU et al. Glucocorticoid resistance in T-lineage acute lymphoblastic leukaemia is associated with a proliferative metabolism. *Br. J. Cancer* 2009; **100**: 1926–36.
  89. Madden EA, Bishop EJ, Fiskin AM & Melnykovych G. Possible role of cholesterol in the susceptibility of a human acute lymphoblastic leukemia cell line to dexamethasone. *Cancer Res.* 1986; **46**: 617–22.
  90. Mayhew CN, Carter SL, Fox SR, Sexton CR, Reed C a, Srinivasan S V et al. RB loss abrogates cell cycle control and genome integrity to promote liver tumorigenesis. *Gastroenterology* 2007; **133**: 976–84.
  91. Rajagopalan PTR, Zhang Z, McCourt L, Dwyer M, Benkovic SJ & Hammes GG. Interaction of dihydrofolate reductase with methotrexate: ensemble and single-molecule kinetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002; **99**: 13481–6.
  92. Li JC & Kaminskas E. Accumulation of DNA strand breaks and methotrexate cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1984; **81**: 5694–8.
  93. Nicholson KM & Anderson NG. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell. Signal.* 2002; **14**: 381–95.
  94. Yamamoto S, Tomita Y, Hoshida Y, Morooka T, Nagano H, Dono K et al. Prognostic significance of activated Akt expression in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2004; **10**: 2846–50.
  95. Ermoian RP, Furniss CS, Lamborn KR, Basila D, Berger MS, Gottschalk AR et al. Dysregulation of PTEN and protein kinase B is associated with glioma histology and patient survival. *Clin. Cancer Res.* 2002; **8**: 1100–6.

96. Subramaniam PS, Whye DW, Efimenko E, Chen J, Tosello V, De Keersmaecker K *et al.* Targeting nonclassical oncogenes for therapy in T-ALL. *Cancer Cell* 2012; **21**: 459–72.
97. 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**: 2096–109.
98. Medyouf H, Gao X, Armstrong F, Gusscott S, Liu Q, Gedman AL *et al.* Acute T-cell leukemias remain dependent on Notch signaling despite PTEN and INK4A/ARF loss. *Blood* 2010; **115**: 1175–84.
99. Delmore JE, Issa GC, Lemieux ME, Rahl PB, Shi J, Jacobs HM *et al.* BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. *Cell* 2011; **146**: 904–17.
100. Ott CJ, Kopp N, Bird L, Paranal RM, Qi J, Bowman T *et al.* BET bromodomain inhibition targets both c-Myc and IL7R in high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2012; **120**: 2843–52.
101. Dördelmann M, Reiter A, Borkhardt A, Ludwig WD, Götz N, Viehmann S *et al.* Prednisone Response Is the Strongest Predictor of Treatment Outcome in Infant Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood* 1999; **94**: 1209–17.
102. Klumper E, Pieters R, Veerman a J, Huismans DR, Loonen a H, Hählen K *et al.* In vitro cellular drug resistance in children with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1995; **86**: 3861–8.
103. Hulleman E, Kazemier KM, Holleman A, VanderWeele DJ, Rudin CM, Broekhuis MJC *et al.* Inhibition of glycolysis modulates prednisolone resistance in acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood* 2009; **113**: 2014–21.
104. Batista A, Barata JT, Raderschall E, Sallan SE, Carlesso N, Nadler LM *et al.* Targeting of active mTOR inhibits primary leukemia T cells and synergizes with cytotoxic drugs and signaling inhibitors. *Exp. Hematol.* 2011; **39**: 457–472.e3.
105. Spijkers-Hagelstein J a P, Pinhanços SS, Schneider P, Pieters R & Stam RW. Chemical genomic screening identifies LY294002 as a modulator of glucocorticoid resistance in MLL-rearranged infant ALL. *Leukemia* 2013; 1–9. doi:10.1038/leu.2013.245
106. Wei G, Twomey D, Lamb J, Schlis K, Agarwal J, Stam RW *et al.* Gene expression-based chemical genomics identifies rapamycin as a modulator of MCL1 and glucocorticoid resistance. *Cancer Cell* 2006; **10**: 331–42.
107. Engelman J, Chen L & Tan X. Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R murine lung cancers. *Nat. Med.* 2008; **14**: 1351–1356.
108. Janku F, Tsimberidou AM, Garrido-Laguna I, Wang X, Luthra R, Hong DS *et al.* PIK3CA mutations in patients with advanced cancers treated with PI3K/AKT/mTOR axis inhibitors. *Mol. Cancer Ther.* 2011; **10**: 558–65.
109. Kaufmann SH. Cell death induced by topoisomerase-targeted drugs: more questions than answers. *Biochim. Biophys. Acta* 1998; **1400**: 195–211.

110. Beesley AH, Firth MJ, Anderson D, Samuels AL, Ford J & Kees UR. Drug-gene modeling in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia highlights importance of 6-mercaptopurine for outcome. *Cancer Res.* 2013; **73**: 2749–59.
111. Homminga I, Pieters R, Langerak AW, de Rooi JJ, Stubbs A, Verstegen M et al. Integrated transcript and genome analyses reveal NKX2-1 and MEF2C as potential oncogenes in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* 2011; **19**: 484–97.
112. 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**: 2474–86.
113. Wandzioch E, Edling CE, Palmer RH, Carlsson L & Hallberg B. Activation of the MAP kinase pathway by c-Kit is PI-3 kinase dependent in hematopoietic progenitor/stem cell lines. *Blood* 2004; **104**: 51–7.
114. Schmidt EK, Fichelson S & Feller SM. PI3 kinase is important for Ras, MEK and Erk activation of Epo-stimulated human erythroid progenitors. *BMC Biol.* 2004; **2**: 7.
115. Tran NH & Frost J a. Phosphorylation of Raf-1 by p21-activated kinase 1 and Src regulates Raf-1 autoinhibition. *J. Biol. Chem.* 2003; **278**: 11221–6.
116. Zimmermann S. Phosphorylation and Regulation of Raf by Akt (Protein Kinase B). *Science* (80-. ). 1999; **286**: 1741–1744.
117. Pellegrini M, Cheng JC, Voutila J, Judelson D, Taylor J, Nelson SF et al. Expression profile of CREB knockdown in myeloid leukemia cells. *BMC Cancer* 2008; **8**: 264.
118. Grewal SS, Fass DM, Yao H, Ellig CL, Goodman RH & Stork PJ. Calcium and cAMP signals differentially regulate cAMP-responsive element-binding protein function via a Rap1-extracellular signal-regulated kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 2000; **275**: 34433–41.
119. Kari V, Karpuk O, Tieg B, Kriegs M, Dikomey E, Krebber H et al. A subset of histone H2B genes produces polyadenylated mRNAs under a variety of cellular conditions. *PLoS One* 2013; **8**: e63745.
120. Sullivan KD, Mullen TE, Marzluff WF & Wagner EJ. Knockdown of SLBP results in nuclear retention of histone mRNA. *RNA* 2009; **15**: 459–72.
121. Pirngruber J, Shchebet A & Johnsen SA. mRNA processing. 2009; **8**: 3636–3642.
122. Shan X, Czar MJ, Bunnell SC, Liu P, Liu Y, Schwartzberg PL et al. Deficiency of PTEN in Jurkat T cells causes constitutive localization of Itk to the plasma membrane and hyperresponsiveness to CD3 stimulation. *Mol. Cell. Biol.* 2000; **20**: 6945–57.
123. Lotan TL, Gurel B, Sutcliffe S, Esopi D, Liu W, Xu J et al. PTEN protein loss by immunostaining: analytic validation and prognostic indicator for a high risk surgical cohort of prostate cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 2011; **17**: 6563–73.
124. Gutierrez A & Look a T. NOTCH and PI3K-AKT pathways intertwined. *Cancer Cell* 2007; **12**: 411–3.

125. Chiu PPL, Jiang H & Dick JE. Leukemia-initiating cells in human T-lymphoblastic leukemia exhibit glucocorticoid resistance. *Blood* 2010; **116**: 5268–79.
126. Zuber J, Shi J, Wang E, Rappaport AR, Herrmann H, Sison EA *et al.* RNAi screen identifies Brd4 as a therapeutic target in acute myeloid leukaemia. *Nature* 2011; **478**: 524–8.
127. Filippakopoulos P, Qi J, Picaud S, Shen Y, Smith WB, Fedorov O *et al.* Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature* 2010; **468**: 1067–73.
128. Mertz J a, Conery AR, Bryant BM, Sandy P, Balasubramanian S, Mele D a *et al.* Targeting MYC dependence in cancer by inhibiting BET bromodomains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011; **108**: 16669–74.
129. Medh RD, Wang a, Zhou F & Thompson EB. Constitutive expression of ectopic c-Myc delays glucocorticoid-evoked apoptosis of human leukemic CEM-C7 cells. *Oncogene* 2001; **20**: 4629–39.
130. Thulasi R, Harbour D V & Thompson EB. Suppression of c-myc is a critical step in glucocorticoid-induced human leukemic cell lysis. *J. Biol. Chem.* 1993; **268**: 18306–12.
131. Tissing WJE, Meijerink JPP, den Boer ML & Pieters R. Molecular determinants of glucocorticoid sensitivity and resistance in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2003; **17**: 17–25.
132. Torti D & Trusolino L. Oncogene addiction as a foundational rationale for targeted anti-cancer therapy: promises and perils. *EMBO Mol. Med.* 2011; **3**: 623–36.
133. Peyssonnaux C & Eychène a. The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. *Biol. Cell* 2001; **93**: 53–62.
134. Liu L, Zhu S, Gong Z & Low BC. K-ras/PI3K-Akt signaling is essential for zebrafish hematopoiesis and angiogenesis. *PLoS One* 2008; **3**: e2850.
135. Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E & Bar-Sagi D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat. Rev. Cancer* 2011; **11**: 761–74.
136. Liu P, Cheng H, Santiago S, Raeder M, Zhang F, Isabella A *et al.* Oncogenic PIK3CA-driven mammary tumors frequently recur via PI3K pathway-dependent and PI3K pathway-independent mechanisms. *Nat. Med.* 2011; **17**: 1116–20.
137. Serra V, Scaltriti M, Prudkin L, Eichhorn PJ a, Ibrahim YH, Chandarlapaty S *et al.* PI3K inhibition results in enhanced HER signaling and acquired ERK dependency in HER2-overexpressing breast cancer. *Oncogene* 2011; **30**: 2547–57.
138. Serra V, Eichhorn PJA, García-García C, Ibrahim YH, Prudkin L, Sánchez G *et al.* RSK3/4 mediate resistance to PI3K pathway inhibitors in breast cancer. *J. Clin. Invest.* 2013; **123**: 2551–63.
139. Edin ML & Juliano RL. Raf-1 Serine 338 Phosphorylation Plays a Key Role in Adhesion-Dependent Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinase by Epidermal Growth Factor Raf-1 Serine 338 Phosphorylation Plays a Key Role in Adhesion-Dependent Activation of Extracellular Sign. 2005; doi:10.1128/MCB.25.11.4466

140. Chiloeches A, Mason CS & Marais R. S338 phosphorylation of Raf-1 is independent of phosphatidylinositol 3-kinase and Pak3. *Mol. Cell. Biol.* 2001; **21**: 2423–34.
141. Chaudhary a, King WG, Mattaliano MD, Frost J a, Diaz B, Morrison DK *et al.* Phosphatidylinositol 3-kinase regulates Raf1 through Pak phosphorylation of serine 338. *Curr. Biol.* 2000; **10**: 551–4.
142. King AJ, Sun H, Diaz B, Barnard D, Miao W, Bagrodia S *et al.* The protein kinase Pak3 positively regulates Raf-1 activity through phosphorylation of serine 338. *Nature* 1998; **396**: 180–3.
143. Du K & Montminy M. CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *J. Biol. Chem.* 1998; **273**: 32377–9.
144. Crans-Vargas HN, Landaw EM, Bhatia S, Sandusky G, Moore TB & Sakamoto KM. Expression of cyclic adenosine monophosphate response-element binding protein in acute leukemia. *Blood* 2002; **99**: 2617–9.
145. Kinjo K, Sandoval S, Sakamoto KM & Shankar DB. The role of CREB as a proto-oncogene in hematopoiesis. *Cell Cycle* 2005; **4**: 1134–5.
146. Shankar DB, Cheng JC & Sakamoto KM. Role of cyclic AMP response element binding protein in human leukemias. *Cancer* 2005; **104**: 1819–24.
147. Sandoval S, Pigazzi M & Sakamoto KM. CREB: A Key Regulator of Normal and Neoplastic Hematopoiesis. *Adv. Hematol.* 2009; **2009**: 634292.
148. Don J & Stelzer G. The expanding family of CREB/CREM transcription factors that are involved with spermatogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2002; **187**: 115–24.
149. De Cesare D, Fimia GM & Sassone-Corsi P. Signaling routes to CREM and CREB: plasticity in transcriptional activation. *Trends Biochem. Sci.* 1999; **24**: 281–5.
150. Osley M a. The regulation of histone synthesis in the cell cycle. *Annu. Rev. Biochem.* 1991; **60**: 827–61.
151. Marzluff WF, Wagner EJ & Duronio RJ. Metabolism and regulation of canonical histone mRNAs: life without a poly(A) tail. *Nat. Rev. Genet.* 2008; **9**: 843–54.
152. Talbert PB & Henikoff S. Histone variants--ancient wrap artists of the epigenome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2010; **11**: 264–75.
153. Collart D, Ramsey-Ewing A, Bortell R, Lian J, Stein J & Stein G. Isolation and characterization of a cDNA from a human histone H2B gene which is reciprocally expressed in relation to replication-dependent H2B histone genes during HL60 cell differentiation. *Biochemistry* 1991; **30**: 1610–7.
154. Zhao H, Langerød A, Ji Y, Nowels KW, Nesland JM, Tibshirani R *et al.* Different gene expression patterns in invasive lobular and ductal carcinomas of the breast. *Mol. Biol. Cell* 2004; **15**: 2523–36.
155. Mangone M, Manoharan AP, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Han T, Mackowiak SD *et al.* The landscape of *C. elegans* 3'UTRs. *Science* 2010; **329**: 432–5.

156. Kirsh a L, Groudine M & Challoner PB. Polyadenylation and U7 snRNP-mediated cleavage: alternative modes of RNA 3' processing in two avian histone H1 genes. *Genes Dev.* 1989; **3**: 2172–2179.
157. Knight Z a, Gonzalez B, Feldman ME, Zunder ER, Goldenberg DD, Williams O *et al.* A pharmacological map of the PI3-K family defines a role for p110alpha in insulin signaling. *Cell* 2006; **125**: 733–47.

# ANEXO 1



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 12/02/09.  
(Grupo II)

**PARECER CEP:** Nº 1105/2008 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)  
**CAAE:** 0014.0.144.146-08

## I - IDENTIFICAÇÃO:

**PROJETO: "MICROAMBIENTE DA MEDULA ÓSSEA E PI3K NA RESISTÊNCIA A DROGAS DA LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA PEDIÁTRICA".**

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** José Andrés Yunes.

**INSTITUIÇÃO:** Centro Infantil de Investigações Hematológicas Dr. Domingos A. Boldrini

**APRESENTAÇÃO AO CEP:** 11/12/2008

**APRESENTAR RELATÓRIO EM: 12/02/10** (O formulário encontra-se no site acima)

## II - OBJETIVOS

1- Quantificar aminoácidos no meio de cultura de células de estroma da medula óssea tratadas com IGFBP7 + ligantes (insulina, IGF-1, IGF-2); 2- Avaliar efeito de IGFBP7+ligantes (insulina, IGF-1, IGF-2) na sobrevivência de células primárias de LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA (LLA) frente à asparaginase, quando em cultura de curta duração, sem estroma; 3- Avaliar efeito de IGFBP7+ligantes (insulina, IGF-1, IGF-2) na expressão de mRNA de ASNS, glutamina sintetase (GS) e de transportadores de aminoácidos nas células de LLA e do estroma; 4- Tratar células de LLA com diferentes oses de EBIO e verificar viabilidade celular frente a diferentes doses de daunorubicina, quantificando a incorporação intracelular da droga através de citometria de fluxo; 5- Desvendar o mecanismo de fluxo intracelular ligado ao KCNN4, usando substratos e inibidores específicos para os diferentes transportadores; 6- Analisar distribuição intracelular da daunorubicina em células de LLA tratadas ou não com EBIO, por microscopia de fluorescência e co-marcação de lisossomos com Lysotracker blue, do Golgi com NBD-C6-Ceramide e do retículo endoplasmático com DiOC6; 7- avaliar uso do clotrimazol (ou TRAM-34) na sensibilização das células de LLA aos agentes quimioterápicos, in vitro e in vivo (em camundongos); 8- Quantificar níveis de mRNA de GPR56 em amostras de 150 pacientes com LLA e buscar associações com características biológico-clínicas dos pacientes; 9- Confirmar a expressão da proteína GPR56 na superfície das células de LLA, por imunocitoquímica; 10- Seqüenciar os exons 3,5,8 e 9 de GPR56 em 30 amostras de DNA ou cDNA de blastos de pacientes e de linhagens de LLA. Serão analisados 3 grupos de pacientes: (i) com doença extramedular ao diagnóstico, (ii) com baixa expressão de GPR56 (<0,05 moléculas de GPR56/ABL), (iii) grupo de pacientes com expressão de GPR56 na mediana; 11- silenciar o GPR56 por iRNA em uma linhagem de LLA e analisar resistência das células a asparaginase quando em cultura com ou sem estroma de medula óssea.

## III - SUMÁRIO

O autor relata que 20% a 30% das crianças com leucemia linfóide aguda (LLA) sofrem recaídas da doença e apresentam maior resistência aos quimioterápicos. Métodos modernos de



**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

• [www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html)

análise de expressão gênica possibilitam a identificação de genes relacionados ao processo de resistência à drogas. Segundo referências apresentadas pelo autor, as células da recaída são altamente proliferativas e mesmo assim mais resistente à quimioterapia, esse processo pode estar relacionado com a maior expressão de genes de reparo do DNA e de anti-apoptose, que compensariam os efeitos da quimioterapia. A interação de blastos leucêmicos com as células estromais da medula óssea (obs: o estroma é o tecido conjuntivo de sustentação de um órgão) aumenta a resistência da LLA à leucemia.

Dois sub-projetos fazem parte do projeto maior. No primeiro a proposta é estudar a função dos genens IGFBP7, KCNN4 e GPR56 na resistência à drogas para o tratamento de LLA, no contexto da interação leucemia-estroma. Para realização desses sub-projeto serão incluídas amostras de sangue/medula óssea de crianças portadoras de leucemia linfóide aguda, sem tratamento prévio, atendidas integralmente no Centro Infantil Boldrini, a pesquisa será feita com o restante do material colhido para diagnóstico e não acarretará em nenhum procedimento ao paciente. É prevista a utilização de 150 amostras retrospectivas. São descritos os procedimentos para obtenção de amostras com, pelo menos, 85% de blastos leucêmicos, basicamente centrifugação diferencial e filtração. As amostras são preservadas em nitrogênio líquido. O controle será feito com amostras provenientes de doadores normais e de pacientes com resultado negativo após exame. O DNA de indivíduos normais será obtido de cartões de triagem neonatal (CIPOI-UNICAMP). Os testes laboratoriais serão realizados com amostras não identificadas e descartadas após seu uso. Segundo o autor a pesquisa com o DNA de tecido estocado não precisa de autorização, desde que seja mantido o anonimato do depositante. O teste de viabilidade e apoptose celular será realizado em cultura em placa, sendo adicionados os produtos de estudo (IGFBP7, insulina, IGF-1, IGF-2, EBIO, clotrimazol, AS605240, daunorubicina, vincristina, asparaginase, corticóide) e avaliação final será colorimétrica.

A quantificação da expressão gênica será por extração total de RNA e síntese de DNA e os mesmos primers utilizados para o PCR também serão usados no sequenciamento.

No segundo sub-projeto existe a proposta de sequênciar o cDNA de IL-7R, e o domínio JH2 de Jak1 e Jak3, dos blastos leucêmicos de 50 casos de LLA-T (linhagem linfocitária - T). Os dados de polimorfismos do IL-7R serão comparados com freqüências publicadas da população caucasiana. Além disso, pretende-se analisar a freqüência dos mesmos polimorfismos em amostras de 40 indivíduos saudáveis da nossa população. Caso seja encontrada alguma mutação no IL-7R ou Jak, o cDNA mutante será clonado, assim como o receptor IL-2R, e ambos serão transfectados em células HEK293 e uma série de testes será realizada.

#### **IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES**

Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

#### **V - PARECER DO CEP**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem



**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

[www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html)

restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

#### **VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES**

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma juntamente com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

#### **VI I- DATA DA REUNIÃO**

Homologado na I Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 20 de janeiro de 2009.

*Carmen Sílvia Bertuzzo*  
**Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo**  
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM/UNICAMP

## ANEXO 2



Campinas, 28 de Janeiro de 2014-01-28

Ao Comitê de Ética em Pesquisa da FCM  
UNICAMP

### DECLARAÇÃO

Informo que a tese "Inibição da via PI3K na leucemia linfóide aguda T pediátrica: resposta à quimioterapia e implicações clínicas" por André Boldrini Silveira, é parte integrante do projeto "Microambiente da medula óssea e PI3K na resistência a drogas da leucemia linfóide aguda pediátrica", por mim coordenado, aprovado pelo CEP/FCM (UNICAMP) em reunião ordinária do CEP/FCM ocorrida no 20/01/2009. Parecer 1105/2008, CAAE: 0014.0.144.146-08.

Fico à disposição para maiores esclarecimentos.

Atenciosamente,

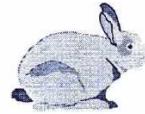
  
José André Yunes  
Laboratório de Biologia Molecular  
F: 3787-5070 / e-mail: andres@boldrini.org.br

*De acordo com o projeto  
que vai para o projeto  
original de André  
Boldrini 28/01/14*  
Prof. Dr. Filipe Ap. Brotto Luiz  
Coordenador do  
Comitê de Ética em Pesquisas  
FCM/UNICAMP  
Matrícula: 00120-5

UFLA: Municipal Lote nº 4957  
UFLA: Instituto Doc. nº 22.018  
UFLA: Pós: Federal Doc. nº 88.247  
Registro no CAAE: C 23.032.000.581/84-0  
UFSC: Edital nº 0000  
CNPJ: 30.046.887/0001-22

Rua Dr. Geraldo Porto, 1270 - Cid. Universitária - Campinas - SP  
Cap: 13083-210 | Tel.: +55 19) 3787-5800  
[www.boldrini.org.br](http://www.boldrini.org.br)

## ANEXO 3



CEEAA/Unicamp

### Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEAA/Unicamp

#### C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 1766-1, sobre "Estudo da via PI3K/AKT/mTOR na Leucemia Linfóide Aguda Pediátrica", sob a responsabilidade de Prof. Dr. José Andrés Yunes / Gilberto C. Franchi Jr., está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 16 de março de 2009.

#### C E R T I F I C A T E

We certify that the protocol nº 1766-1, entitled "Studies of PI3K/AKT/mTOR pathway in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on March 16, 2009.

Campinas, 16 de março de 2009.

Handwritten signature of Ana Maria A. Guaraldo.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

Fátima Alonso  
Secretária Executiva

## ANEXO 4 (Supplementary Table 1)

ProbeSet	Gene Symbol	logFC	adj.P.Val	ProbeSet	Gene Symbol	logFC	adj.P.Val
7943552	AASDHPPPT	-0.597	1.47E-06	8175457	MCF2	0.732	1.16E-05
7903119	ABCD3	-0.595	1.02E-06	8042259	MDH1	-0.635	1.06E-05
8122336	ABRACL	-0.629	4.99E-06	8020827	MEP1B	0.620	2.86E-05
8134415	ACN9	-0.591	3.26E-06	8022009	METTL4	-0.606	9.33E-07
7930498	ACSL5	-0.590	1.97E-05	8013341	MFAP4	-0.586	1.49E-04
7974587	ACTR10	-0.977	4.18E-07	8102831	MGARP	0.697	2.23E-04
7922058	ADCY10	1.133	1.84E-06	7906978	MGST3	-0.587	2.04E-06
8101844	ADH5	-0.585	6.14E-06	8089040	MINA	-0.647	1.13E-04
7903239	AGL	-0.720	3.38E-06	8051066	MPV17	-0.747	1.03E-06
8175052	AIFM1	-0.634	1.50E-06	7952046	MPZL2	1.238	7.43E-06
7950654	ALG8	-0.639	1.06E-05	8098195	MSMO1	-0.618	9.92E-04
7968344	ALOX5AP	-1.158	9.33E-07	7926661	MSRB2	-0.762	2.68E-06
7928300	ANAPC16	-0.656	3.05E-06	7947934	MTCH2	-0.591	2.11E-05
7934898	ANKRD22	-0.627	2.15E-05	8042576	NAGK	-0.790	2.74E-06
8042468	ANXA4	-0.773	3.05E-06	7986757	NDN	-0.627	3.98E-06
7922804	APOBEC4	0.650	3.78E-02	8163930	NDUFA8	-0.588	7.43E-06
8107429	AQPEP	0.624	8.45E-04	8082643	NEK11	0.605	7.39E-05
8097813	ARFIP1	-0.652	1.85E-06	7965956	NFYB	-0.657	2.81E-06
8129458	ARHGAP18	-0.682	1.66E-06	8038809	NKG7	-0.654	1.31E-05
7965789	ARL1	-0.646	2.68E-06	7911178	NLRP3	-0.663	3.19E-05
8007493	ARL4D	0.604	1.18E-05	7922627	NPHS2	0.587	1.34E-05
8174092	ARMCX2	-0.726	8.01E-06	8104758	NPR3	1.110	1.76E-04
8168958	ARMCX5	-0.795	2.04E-06	8165508	NRARP	0.759	1.82E-04
8149534	ASAH1	-0.687	5.40E-06	8113504	NREP	-0.925	2.04E-06
7961829	BCAT1	-0.770	5.81E-06	7910591	NTPCR	-0.618	4.57E-06
7943867	BCO2	0.611	4.15E-05	8001496	NUDT21	-0.588	1.47E-06
8141024	BET1	-0.645	2.00E-05	7918504	OVGP1	0.898	1.21E-04
8116818	BMP6	0.654	1.71E-04	8102214	PAPSS1	-0.619	4.54E-06
7978527	C14orf126	-0.676	1.47E-06	8082886	PCCB	-0.782	4.79E-06
7980990	C14orf142	-0.688	1.32E-05	8027642	PDCD2L	-0.615	3.05E-06
7979400	C14orf37	0.912	1.47E-06	8166335	PDHA1	-0.588	1.48E-05
7903980	C1orf162	0.666	3.17E-05	8036010	PEPD	-0.593	1.65E-05
7960874	C3AR1	-0.780	1.94E-05	8168500	PGK1	-0.622	1.47E-06
8090567	C3orf25	1.192	1.10E-05	7904433	PHGDH	-0.905	5.71E-06
8102518	C4orf3	-0.686	1.02E-06	7995382	PHKB	-0.715	3.02E-06
8121002	C6orf162	-0.653	1.34E-05	8139746	PHKG1	0.832	4.19E-05
8135532	C7orf53	0.633	6.91E-06	8051993	PIGF	-0.620	5.20E-05
8146711	C8orf44	-0.593	4.56E-04	7917088	PIGK	-0.832	9.33E-07
8096808	CCDC109B	-0.605	1.41E-05	8023605	PIGN	-0.627	3.97E-06
7900555	CCDC30	0.797	1.79E-04	8075483	PIK3IP1	0.742	6.15E-06
7965846	CCDC53	-0.622	9.35E-05	7990151	PKM	-0.585	3.17E-06
7959484	CCDC62	0.856	6.72E-06	8083146	PLS1	-0.631	1.47E-06
7942941	CCDC81	0.994	9.88E-06	8119052	PNPLA1	0.636	2.50E-05
8151871	CCNE2	-0.590	1.39E-04	7919197	POLR3GL	-0.675	7.94E-06
7989037	CCPG1	-0.670	2.49E-06	8041713	PPM1B	-0.811	1.42E-06
8078442	CCR4	-0.658	2.95E-05	8101971	PPP3CA	-0.816	8.48E-06
8042720	CCT7	-0.824	9.33E-07	7915286	PPT1	-0.741	4.57E-06
8025301	CD209	0.907	9.26E-05	8166455	PRDX4	-0.757	4.95E-06
7953333	CD27	-0.585	2.47E-05	8110318	PRELID1	-0.609	3.17E-06

ProbeSet	Gene Symbol	logFC	adj.P.Val	ProbeSet	Gene Symbol	logFC	adj.P.Val
7903893	CD53	-0.830	1.51E-06	8160238	PSIP1	-0.864	1.40E-05
8065359	CD93	-0.642	7.39E-05	7985202	PSMA4	-0.617	1.91E-06
8113050	CETN3	-0.791	1.47E-06	8118571	PSMB9	-0.625	4.99E-06
8002266	CHTF8	-0.645	1.14E-06	8178211	PSMB9	-0.625	4.99E-06
8102877	CLGN	-1.008	1.47E-06	8179495	PSMB9	-0.625	4.99E-06
7989975	CLN6	-0.616	1.38E-04	7905374	PSMD4	-0.624	2.04E-06
8106556	CMYA5	0.931	2.74E-06	8052418	PUS10	-0.598	1.39E-04
8021727	CNDP2	-0.605	1.47E-06	7962427	PUS7L	-0.784	2.68E-06
8071289	COMT	-0.644	1.47E-06	8013112	RASD1	0.639	2.88E-05
7967072	COQ5	-0.670	1.47E-06	8065230	RBBP9	-0.640	5.25E-06
8047829	CPO	0.701	1.06E-05	7944011	REXO2	-0.974	1.86E-06
8133938	CROT	-0.647	4.05E-06	7968653	RFXAP	-0.779	1.47E-06
7917037	CRYZ	-0.674	2.61E-06	7908376	RGS18	-1.030	4.51E-06
8095886	CXCL13	1.014	3.74E-06	7908409	RGS2	0.652	2.27E-04
8023855	CYB5A	-0.740	1.09E-05	7975482	RGS6	0.594	3.98E-04
8173745	CYSLTR1	-0.675	9.66E-04	7922707	RNASEL	-0.767	3.13E-05
8094843	DCAF4L1	0.758	8.85E-06	8116372	RNF130	-0.672	1.77E-06
8040386	DDX1	-0.687	1.47E-06	8121927	RNF146	-0.669	1.83E-06
7950067	DHCR7	-0.693	4.26E-04	8017162	RNFT1	-0.774	1.29E-06
8112312	DIMT1	-0.642	2.68E-06	8116952	RNU1-11P	0.642	1.27E-03
8046759	DNAJC10	-0.729	1.14E-06	7967028	RNU4-2	0.688	8.43E-04
7946559	DNAJC25	-0.710	1.98E-05	8112176	RNU6ATAC	0.597	6.79E-04
7937217	ECHS1	-0.663	1.47E-06	8043413	RPIA	-0.695	1.47E-06
7912198	ENO1	-0.649	1.47E-06	7989493	RPS27L	-0.612	1.68E-05
8175102	ENOX2	-0.670	2.10E-06	8085233	RPUSD3	-0.628	1.28E-06
8107321	EPB41L4A	0.591	5.48E-05	8087790	RRP9	-0.620	7.64E-05
7910111	EPHX1	1.161	1.47E-06	7920128	S100A11	-0.690	8.43E-06
8148978	ERICH1	0.728	1.47E-06	8140971	SAMD9L	-0.601	9.61E-06
8145570	ESCO2	-0.595	4.14E-05	8064418	SDCBP2	1.207	1.12E-04
7985268	FAH	-0.595	1.95E-05	8011212	SDHC	-0.588	3.02E-06
8115375	FAM114A2	-0.666	1.47E-06	8021453	SEC11C	-0.595	7.12E-06
8082066	FAM162A	-0.607	6.23E-04	8062933	SEMG1	1.138	6.68E-07
8110966	FAM173B	-0.847	2.04E-06	7922420	SERPINC1	0.593	3.10E-05
8101489	FAM175A	-0.728	2.68E-06	8152988	SLA	-0.626	5.90E-06
8121429	FIG4	-0.671	3.02E-06	7921625	SLAMF6	-0.586	4.07E-05
8120428	FKBP1A	-0.955	1.47E-06	7983650	SLC27A2	-0.596	2.68E-05
8064432	FKBP1A	-0.700	2.46E-04	8041257	SLC30A6	-0.634	9.93E-06
7902308	FPGT	-0.819	1.47E-06	8121031	SLC35A1	-0.645	1.06E-05
8155699	FXN	-0.629	1.72E-05	8112121	SLC38A9	-0.706	9.63E-06
8147766	FZD6	-0.601	2.68E-06	8063382	SNAI1	0.662	2.52E-04
8156309	GADD45G	0.748	3.98E-05	7948910	SNHG1	0.986	1.18E-05
8098328	GALNT7	-0.744	1.24E-05	7914202	SNHG12	0.631	2.11E-05
7917561	GBP4	-0.606	1.95E-05	8063345	SNORD12C	0.666	5.50E-05
8086028	GLB1	-0.774	7.82E-07	7901046	SNORD38B	0.854	2.90E-05
7984517	GLCE	-0.702	3.17E-06	8152062	SNX31	0.829	3.56E-06
8155192	GLIPR2	-0.695	3.02E-06	8080438	SPCS1	-0.708	3.02E-06
8113214	GLRX	-0.661	1.02E-06	8041138	SPDYA	0.782	5.46E-06
8087985	GLT8D1	-0.674	1.47E-06	8148280	SQL	-0.658	7.33E-04
8119620	GNMT	0.623	1.04E-04	8095139	SRD5A3	-0.694	2.04E-06
8114787	GNPDA1	-0.836	3.02E-06	7935002	SRP9	-0.676	2.04E-06
7979196	GNPNAT1	-0.706	3.05E-06	7910099	SRP9	-0.651	4.41E-06
7964701	GNS	-0.781	1.47E-06	7951008	TAF1D	0.708	1.72E-05
8168968	GPRASP1	-0.773	5.69E-06	8173732	TAF9B	-0.856	2.74E-06

ProbeSet	Gene Symbol	logFC	adj.P.Val	ProbeSet	Gene Symbol	logFC	adj.P.Val
8083129	GRK7	0.789	2.37E-03	8176263	TAF9B	-0.856	2.74E-06
8007620	GRN	-0.618	5.39E-06	7943859	TEX12	0.630	4.29E-05
8065817	GSS	-0.690	4.57E-06	8052925	TEX261	-1.049	1.02E-06
8123038	GTF2H5	-0.645	1.27E-05	7972674	TEX30	-0.637	8.06E-06
8124391	HIST1H2AB	0.820	1.31E-05	7985493	TM6SF1	-0.729	5.24E-05
8117535	HIST1H2AG	0.683	1.97E-04	7961983	TM7SF3	-0.646	3.62E-06
8117543	HIST1H2AH	0.678	4.09E-05	7955063	TMEM106C	-0.891	1.47E-06
8124518	HIST1H2AJ	0.684	5.69E-03	8116867	TMEM14B	-0.669	1.42E-04
8117608	HIST1H2AL	0.736	4.14E-04	7957167	TMEM19	-0.676	1.47E-06
8124394	HIST1H2BB	0.686	2.96E-04	7952484	TMEM218	-0.676	2.71E-06
8117389	HIST1H2BE	0.629	1.57E-05	8129476	TMEM244	0.683	5.57E-04
8117330	HIST1H3A	0.657	2.64E-04	8152976	TMEM71	-0.591	4.95E-05
8117339	HIST1H3C	0.650	4.18E-05	7923319	TMEM9	-0.613	2.48E-05
8124537	HIST1H3F	0.882	4.37E-05	7957737	TMPO	-0.677	1.74E-05
8117334	HIST1H4A	0.632	3.44E-05	7972579	TMTC4	-0.591	1.64E-05
8124413	HIST1H4D	0.657	5.47E-04	7922343	TNFSF4	-1.196	1.85E-06
7919637	HIST2H2BE	0.595	1.34E-04	7909455	TRAF3IP3	-0.617	2.24E-05
8091354	HLTF	-0.595	1.24E-05	8126402	TRERF1	-0.710	4.99E-06
8101637	HSD17B13	0.909	1.14E-04	8126428	TRERF1	-0.710	4.99E-06
7966356	HVCN1	-0.607	1.10E-05	7946089	TRIM5	-0.690	1.47E-06
8061564	ID1	0.685	5.13E-04	7938012	TRIM6-TRIM34	-0.695	6.14E-05
8040103	ID2	0.618	3.32E-03	8133625	TRIM73	0.604	1.11E-04
7914127	IFI6	-0.760	9.33E-07	8077353	TRNT1	-0.608	3.37E-06
8171052	IL9R	-0.796	2.27E-04	7908147	TSEN15	-0.998	9.33E-07
8176972	IL9R	-0.796	2.27E-04	7910550	TSNAX-DISC1	-0.778	9.33E-07
8163428	INIP	-0.599	1.47E-06	8136495	TTC26	-0.658	2.74E-06
8107814	ISOC1	-0.667	1.58E-06	7927658	UBE2D1	-0.591	2.16E-05
8048995	ITM2C	-0.680	1.47E-06	8109597	UBLCP1	-0.750	9.33E-07
7916609	JUN	0.594	6.38E-04	8111524	UGT3A2	-0.741	6.55E-06
8058614	LANCL1	-0.647	1.85E-06	7936937	UROS	-0.633	3.62E-06
8114861	LARS	-0.693	8.53E-06	8014081	UTP6	-0.729	2.68E-06
7971461	LCP1	-0.678	3.48E-06	7966343	VPS29	-0.636	5.24E-04
7938777	LDHA	-0.698	3.38E-06	7981290	WARS	-0.810	1.72E-06
7947199	LGR4	0.744	1.83E-04	7918517	WDR77	-0.604	6.19E-06
7963187	LIMA1	-0.616	1.47E-06	8005765	WSB1	-0.619	7.26E-06
7900603	LOC100129924	0.813	1.68E-05	7949577	YIF1A	-0.670	1.47E-06
8115732	LOC100133106	0.608	1.95E-05	7899943	ZMYM1	-0.625	1.47E-06
7934920	LOC100507575	-0.850	7.82E-07	8027674	ZNF302	-0.592	4.99E-06
8142431	LOC401397	-0.586	2.11E-05	8028206	ZNF345	-0.595	3.31E-05
7906622	LY9	-0.699	7.23E-06	7987361	ZNF770	-0.596	1.53E-05
7954460	LYRM5	-0.606	7.47E-05	8036813	ZNF780B	-0.602	2.28E-05
8107859	LYRM7	-0.799	2.68E-06	8107353	ZRSR1	0.653	4.51E-05
8171725	MAP7D2	0.892	2.74E-06				

## ANEXO 5 (Supplementary Table 2)

ProbeSet	GeneSymbol	logFC	adj.P.Val	ProbeSet	GeneSymbol	logFC	adj.P.Val
209460_at	ABAT	0.680	6.05E-05	213776_at	LOC157562	0.817	1.43E-03
209459_s_at	ABAT	0.768	4.88E-05	229007_at	LOC283788	0.772	8.56E-06
203981_s_at	ABCD4	0.614	1.13E-05	230588_s_at	LOC285074	0.781	9.42E-05
201872_s_at	ABCE1	-0.628	6.37E-05	239762_at	LOC286437	0.605	4.56E-02
209246_at	ABCF2	-0.594	1.89E-05	238790_at	LOC374443	0.658	8.20E-04
226442_at	ABTB1	1.264	4.55E-06	218380_at	LOC728392	0.671	1.92E-05
229164_s_at	ABTB1	1.560	1.96E-06	227252_at	LRP10	0.595	6.84E-04
214358_at	ACACA	-0.755	6.33E-05	229231_at	LRRC37B	0.861	3.83E-06
218168_s_at	ADCK3	0.641	3.92E-05	207339_s_at	LTB	0.612	1.16E-03
236832_at	ADCY10P1	0.635	3.81E-03	225748_at	LTV1	-0.722	2.96E-05
202912_at	ADM	-0.868	1.69E-03	223414_s_at	LYAR	-0.979	3.83E-06
219361_s_at	AEN	-0.968	1.43E-05	223413_s_at	LYAR	-0.899	1.52E-05
226665_at	AHSA2	0.692	8.47E-05	211686_s_at	MAK16	-0.827	1.89E-05
202138_x_at	AIMP2	-0.662	3.86E-05	202655_at	MANF	-0.969	5.28E-05
209971_x_at	AIMP2	-0.656	2.87E-05	221824_s_at	MARCH8	0.797	3.83E-06
209160_at	AKR1C3	0.769	2.73E-04	243529_at	MARS2	-0.783	7.92E-06
221589_s_at	ALDH6A1	0.588	5.50E-05	219952_s_at	MCOLN1	0.585	9.32E-05
204290_s_at	ALDH6A1	0.647	5.45E-05	204027_s_at	METTL1	-0.706	1.22E-05
221588_x_at	ALDH6A1	0.682	3.91E-05	232102_at	METTL6	0.658	5.60E-04
228817_at	ALG9	0.586	3.66E-05	223242_s_at	MFSD11	0.590	2.44E-04
226012_at	ANKRD11	0.618	1.27E-04	205904_at	MICA	0.720	6.34E-04
227877_at	ANXA2R	1.088	5.21E-04	213189_at	MINA	-0.719	1.92E-05
228415_at	AP1S2	0.638	1.06E-05	213188_s_at	MINA	-0.654	5.95E-05
213215_at	AP3S2	0.690	2.68E-05	212594_at	MIR4680	0.741	9.39E-05
226358_at	APH1B	0.595	6.72E-05	202730_s_at	MIR4680	0.870	1.68E-04
221031_s_at	APOLD1	0.757	9.89E-05	202731_at	MIR4680	0.887	1.17E-04
229906_at	ARMC7	0.898	3.25E-05	212593_s_at	MIR4680	1.014	3.40E-05
226055_at	ARRDC2	0.600	2.02E-05	212347_x_at	MIR4800	0.700	9.23E-06
227700_x_at	ATAD3A	-0.882	5.73E-06	210778_s_at	MIR4800	0.757	1.61E-05
219068_x_at	ATAD3A	-0.785	1.04E-05	212346_s_at	MIR4800	1.045	5.17E-06
1552641_s_at	ATAD3A	-0.840	1.17E-05	229304_s_at	MLF1IP	0.636	2.87E-05
227237_x_at	ATAD3B	-0.782	1.12E-04	229305_at	MLF1IP	0.690	1.89E-05
223617_x_at	ATAD3B	-0.640	6.67E-05	235352_at	MR1	0.884	3.83E-06
213300_at	ATG2A	0.670	3.68E-05	223154_at	MRPL1	-0.729	1.89E-05
212672_at	ATM	0.625	2.00E-05	224331_s_at	MRPL36	-0.619	6.55E-05
214762_at	ATP6V1G2	0.684	1.87E-04	223742_at	MRPL4	-0.591	7.94E-05
1554704_at	ATP8B3	0.682	8.27E-04	210008_s_at	MRPS12	-0.633	2.72E-04
238662_at	ATPB4D	-0.678	5.62E-05	223156_at	MRPS23	-0.587	4.07E-05
211692_s_at	BBC3	0.659	2.15E-05	219477_s_at	MRPS31P3	0.730	8.92E-05
228993_s_at	BBIP1	0.821	2.79E-05	220688_s_at	MRT04	-0.670	5.25E-05
218471_s_at	BBS1	0.733	7.41E-05	235783_at	MRT04	-0.623	7.65E-05
212745_s_at	BBS4	0.596	1.27E-04	209146_at	MSMO1	-0.994	1.17E-04
227896_at	BCCIP	-0.651	9.12E-05	226852_at	MTA3	0.598	9.82E-05
201170_s_at	BHLHE40	-0.939	2.51E-04	231094_s_at	MTHFD1L	-0.715	1.49E-04
202094_at	BIRC5	0.639	2.08E-05	221250_s_at	MXD3	0.891	4.14E-06
226530_at	BMF	0.592	7.59E-04	219098_at	MYBBP1A	-0.777	1.08E-05
202227_s_at	BRD8	0.727	1.80E-05	235383_at	MYO7B	0.620	5.74E-05
225446_at	BRWD1	0.741	1.68E-05	213375_s_at	N4BP2L1	0.620	4.09E-04
201236_s_at	BTG2	0.687	1.23E-04	214748_at	N4BP2L2	0.980	6.37E-05

ProbeSet	GeneSymbol	logFC	adj.P.Val	ProbeSet	GeneSymbol	logFC	adj.P.Val
207485_x_at	BTN3A1	0.621	3.42E-05	222837_s_at	NAA15	-0.642	6.33E-05
212613_at	BTN3A2	0.684	1.68E-05	219158_s_at	NAA15	-0.637	1.93E-04
209846_s_at	BTN3A2	0.725	3.50E-05	205090_s_at	NAGPA	0.617	1.63E-04
204820_s_at	BTN3A2	0.691	2.65E-05	212854_x_at	NBPF10	0.599	5.95E-05
203612_at	BYSL	-0.680	1.04E-04	201384_s_at	NBR1	0.653	2.60E-05
1552422_at	C10orf25	0.690	3.68E-05	218414_s_at	NDE1	0.783	4.72E-06
225334_at	C10orf32	0.891	4.93E-06	200632_s_at	NDRG1	0.703	1.85E-03
219099_at	C12orf5	-0.780	1.89E-04	219006_at	NDUFAF4	-0.669	3.31E-05
226692_at	C15orf63	0.604	3.22E-04	230283_at	NEURL2	0.709	5.48E-05
223407_at	C16orf48	0.600	3.64E-04	225875_s_at	NIPAL3	0.649	2.01E-05
226657_at	C17orf103	1.237	1.02E-05	225876_at	NIPAL3	0.652	1.85E-05
213195_at	C17orf108	0.589	3.12E-04	203023_at	NOP16	-0.654	2.15E-04
225967_s_at	C17orf89	-0.677	8.40E-05	214011_s_at	NOP16	-0.652	5.56E-05
1558693_s_at	C1orf85	0.597	1.29E-04	229838_at	NUCB2	0.604	9.74E-05
225401_at	C1orf85	0.711	4.17E-05	205135_s_at	NUFIP1	-0.648	2.65E-05
1558692_at	C1orf85	1.189	3.69E-05	238474_at	NUP43	0.765	1.82E-03
218983_at	C1RL	0.598	6.10E-04	226140_s_at	OTUD1	0.940	5.62E-06
221954_at	C20orf111	0.593	7.49E-05	235259_at	PACRGL	0.733	1.28E-04
221878_at	C2orf68	0.605	6.03E-05	218886_at	PAK1IP1	-0.971	4.55E-06
226688_at	C3orf23	0.785	5.70E-06	227626_at	PAQR8	0.686	1.27E-05
229826_at	C3orf78	-0.644	1.12E-03	214176_s_at	PBXIP1	0.628	1.64E-04
224990_at	C4orf34	0.811	1.46E-04	207838_x_at	PBXIP1	0.841	6.03E-05
230405_at	C5orf56	1.099	3.67E-06	212259_s_at	PBXIP1	1.015	1.98E-06
220755_s_at	C6orf48	0.940	2.15E-05	214177_s_at	PBXIP1	1.117	4.72E-06
229146_at	C7orf31	0.786	9.31E-05	223712_at	PCBD2	0.852	9.23E-06
1555241_at	C8orf59	-0.877	1.56E-04	227969_at	PCBP1-AS1	0.607	2.07E-04
1555243_x_at	C8orf59	-0.629	2.06E-03	212406_s_at	PCMTD2	0.660	1.88E-05
230521_at	C9orf100	0.883	1.43E-05	202465_at	PCOLCE	0.681	3.14E-05
230522_s_at	C9orf100	0.953	5.66E-05	224467_s_at	PDCD2L	-0.630	5.90E-05
209002_s_at	CALCOCO1	0.618	1.26E-04	220865_s_at	PDSS1	-0.628	1.88E-05
224910_at	CARHSP1	0.606	1.92E-05	203879_at	PIK3CD	0.862	1.67E-05
212914_at	CBX7	0.737	5.59E-06	209193_at	PIM1	0.824	6.47E-05
218125_s_at	CCDC25	0.632	2.12E-04	204269_at	PIM2	0.801	2.89E-03
209479_at	CCDC28A	0.965	9.23E-06	204691_x_at	PLA2G6	0.610	8.33E-04
235244_at	CCDC58	-0.591	1.63E-02	210647_x_at	PLA2G6	0.675	2.73E-05
203119_at	CCDC86	-1.226	1.96E-06	205125_at	PLCD1	0.674	7.04E-04
217988_at	CCNB1IP1	0.746	6.33E-05	227037_at	PLD6	-0.634	2.96E-04
223084_s_at	CCNDBP1	0.588	3.16E-05	219961_s_at	PLK1S1	0.677	1.68E-05
228081_at	CCNG2	0.904	1.02E-05	228291_s_at	PLK1S1	0.737	1.61E-05
202770_s_at	CCNG2	1.135	3.83E-06	203622_s_at	PNO1	-1.075	3.83E-06
202769_at	CCNG2	1.150	2.43E-06	225291_at	PNPT1	-0.612	8.40E-05
211559_s_at	CCNG2	1.197	5.47E-06	209034_at	PNRC1	0.800	1.89E-05
205264_at	CD3EAP	-0.751	3.15E-05	206653_at	POLR3G	-0.892	2.38E-05
202910_s_at	CD97	0.762	3.91E-05	232181_at	PPARGC1B	-0.658	1.61E-04
219831_at	CDKL3	0.607	3.67E-04	213225_at	PPM1B	0.662	3.85E-05
209172_s_at	CENPF	0.591	2.91E-04	202014_at	PPP1R15A	0.691	1.09E-04
212675_s_at	CEP68	0.681	2.96E-05	37028_at	PPP1R15A	0.715	1.49E-04
219531_at	CEP72	0.691	1.58E-05	228646_at	PPP1R1C	0.688	1.33E-04
235427_at	CFLAR	0.750	1.92E-05	203737_s_at	PPRC1	-0.715	3.08E-05
219270_at	CHAC1	-0.673	3.53E-02	201923_at	PRDX4	-0.632	2.89E-05
235117_at	CHAC2	-0.824	2.87E-05	228722_at	PRMT2	0.728	5.73E-06
224932_at	CHCHD10	-0.663	1.60E-05	227325_at	PRR24	0.673	5.28E-05
225951_s_at	CHD2	0.901	1.92E-05	212805_at	PRUNE2	0.626	9.98E-04

ProbeSet	GeneSymbol	logFC	adj.P.Val	ProbeSet	GeneSymbol	logFC	adj.P.Val
229423_at	CHEK1	0.585	5.84E-04	226577_at	PSEN1	0.618	1.76E-05
204233_s_at	CHKA	-0.608	5.95E-05	200988_s_at	PSME3	-0.620	4.09E-05
204193_at	CHKB	0.592	5.83E-05	209852_x_at	PSME3	-0.617	4.34E-05
218566_s_at	CHORDC1	-0.746	3.00E-04	209853_s_at	PSME3	-0.612	4.19E-05
228519_x_at	CIRBP	0.707	3.66E-05	200987_x_at	PSME3	-0.591	5.11E-05
235522_at	CLEC2D	0.617	1.07E-02	228217_s_at	PSMG4	-0.756	8.42E-05
214683_s_at	CLK1	0.877	2.43E-06	218371_s_at	PSPC1	0.678	5.64E-05
210346_s_at	CLK4	0.671	1.16E-05	1554614_a_at	PTBP2	0.644	5.27E-05
228751_at	CLK4	0.739	2.02E-05	218683_at	PTBP2	0.697	1.58E-05
205518_s_at	CMAHP	0.709	3.20E-04	1569830_at	PTPRC	0.866	2.34E-04
210571_s_at	CMAHP	0.820	8.42E-05	218732_at	PTRH2	-0.799	1.04E-05
209797_at	CNPY2	-0.715	1.31E-04	218984_at	PUS7	-0.848	4.57E-06
235533_at	COX19	0.637	3.92E-05	228113_at	RAB37	0.952	2.00E-05
226455_at	CREB3L4	0.881	1.04E-05	204547_at	RAB40B	0.652	1.12E-04
238476_at	CREBRF	0.670	3.40E-05	228980_at	RAD51L3	0.725	6.33E-05
235556_at	CREBRF	0.680	6.11E-05	204828_at	RAD9A	0.623	3.17E-05
225956_at	CREBRF	0.907	5.70E-06	206591_at	RAG1	0.761	2.08E-04
203445_s_at	CTDSP2	0.853	1.04E-05	204346_s_at	RASSF1	0.675	1.89E-05
36566_at	CTNS	0.607	5.56E-05	212168_at	RBM12	-0.737	1.88E-04
202613_at	CTPS1	-0.668	9.89E-05	226404_at	RBM39	0.664	5.70E-06
226410_at	CTU2	-0.790	2.85E-05	228304_at	RBM43	0.950	4.55E-06
216607_s_at	CYP51A1	-0.662	1.01E-03	229999_at	RBMX	0.939	4.18E-05
202314_at	CYP51A1	-0.593	1.20E-03	235597_s_at	RGPD1	0.774	5.56E-05
235478_at	DCLRE1C	0.737	1.95E-05	202988_s_at	RGS1	0.895	4.12E-03
203409_at	DDB2	0.592	5.74E-05	216834_at	RGS1	1.212	2.47E-03
208152_s_at	DDX21	-0.793	1.04E-05	209071_s_at	RGS5	0.802	7.20E-05
224654_at	DDX21	-0.779	9.40E-06	1570253_a_at	RHEBL1	0.687	3.61E-04
218858_at	DEPTOR	0.693	1.92E-04	225866_at	RPF2	-1.022	1.98E-06
200862_at	DHCR24	-0.690	3.08E-05	229590_at	RPL13	0.596	2.96E-05
201791_s_at	DHCR7	-0.877	3.31E-05	213223_at	RPL28	0.646	7.77E-05
201790_s_at	DHCR7	-0.876	8.40E-05	200962_at	RPL31	0.792	1.10E-05
223054_at	DNAJB11	-0.692	3.31E-05	213427_at	RPP40	-0.752	1.04E-05
210487_at	DNTT	0.729	2.40E-03	235309_at	RPS15A	0.646	8.60E-05
1566363_at	DNTT	0.849	8.58E-05	216247_at	RPS20	1.042	1.93E-05
225195_at	DPH3	-0.665	1.61E-04	1554080_at	RQCD1	-0.642	1.74E-04
213391_at	DPY19L4	0.700	1.61E-05	216913_s_at	RRP12	-0.770	1.04E-05
204954_s_at	DYRK1B	0.935	9.59E-05	219037_at	RRP15	-0.818	2.01E-05
201323_at	EBNA1BP2	-0.610	3.87E-05	214764_at	RRP15	-0.595	8.42E-05
218282_at	EDEM2	0.644	4.84E-05	225788_at	RRP36	-0.613	1.14E-04
204905_s_at	EEF1E1	-0.699	9.23E-06	204133_at	RRP9	-0.780	1.38E-05
225630_at	EEPD1	0.660	2.35E-03	209567_at	RRS1	-0.960	3.05E-05
1557674_s_at	EFCAB2	0.686	2.87E-04	213797_at	RSAD2	0.725	6.48E-05
219833_s_at	EFHC1	0.748	1.04E-05	242625_at	RSAD2	0.881	1.65E-05
225656_at	EFHC1	0.846	1.04E-05	222614_at	RWDD2B	0.682	4.17E-05
218488_at	EIF2B3	-0.627	3.78E-05	229069_at	SARNP	0.776	3.43E-05
227930_at	EIF2C4	0.700	1.19E-05	225272_at	SAT2	0.622	1.13E-03
201144_s_at	EIF2S1	-0.685	7.85E-05	211708_s_at	SCD	-0.878	1.35E-05
230479_at	EIF3F	0.701	8.40E-05	211162_x_at	SCD	-0.759	5.56E-05
215082_at	ELOVL5	0.655	4.77E-04	200832_s_at	SCD	-0.625	8.49E-04
209233_at	EMG1	-0.866	4.55E-06	226923_at	SCFD2	-0.728	2.21E-05
225698_at	EPB41L4A	1.074	1.43E-05	207910_at	SCGB1D1	-0.709	4.21E-06
219905_at	ERMAP	0.973	1.52E-05	218681_s_at	SDF2L1	-0.854	3.14E-05
1555880_at	ERVFRD-1	0.963	5.89E-03	221931_s_at	SEH1L	-0.615	3.66E-05

ProbeSet	GeneSymbol	logFC	adj.P.Val	ProbeSet	GeneSymbol	logFC	adj.P.Val
232191_at	ERVH48-1	0.712	8.40E-05	204563_at	SELL	0.634	5.50E-04
201573_s_at	ETF1	-0.665	3.18E-05	201586_s_at	SFPQ	-0.625	2.65E-04
204774_at	EVI2A	0.987	6.11E-05	201585_s_at	SFPQ	-0.619	3.90E-04
211742_s_at	EVI2B	0.799	1.52E-05	214016_s_at	SFPQ	0.828	1.02E-05
203249_at	EZH1	0.587	4.63E-05	218851_s_at	SFT2D3	0.588	3.09E-04
221602_s_at	FAIM3	0.984	4.03E-04	226673_at	SH2D3C	0.657	1.31E-04
221601_s_at	FAIM3	1.026	3.24E-04	205856_at	SLC14A1	0.593	3.27E-04
224785_at	FAM100B	0.692	2.87E-04	221020_s_at	SLC25A32	-0.746	2.87E-05
224783_at	FAM100B	0.725	6.19E-05	217122_s_at	SLC35E2	0.701	5.17E-06
239047_at	FAM122C	0.709	2.03E-04	212110_at	SLC39A14	-0.610	3.25E-05
218518_at	FAM13B	0.876	1.02E-05	224609_at	SLC44A2	0.585	7.99E-05
227270_at	FAM200B	0.703	1.58E-05	225175_s_at	SLC44A2	0.685	6.78E-05
236321_at	FAM200B	0.871	1.80E-04	236016_at	SMARCE1	0.643	1.76E-05
225327_at	FAM214A	0.949	3.83E-06	223188_at	SMG9	0.672	1.60E-05
211068_x_at	FAM21A	0.626	2.81E-05	221335_x_at	SMG9	0.800	5.73E-06
231146_at	FAM24B	0.907	1.58E-05	1555680_a_at	SMOX	0.597	4.69E-04
212333_at	FAM98A	-0.605	1.56E-04	210357_s_at	SMOX	0.875	6.95E-05
212218_s_at	FASN	-0.677	5.81E-05	224610_at	SNHG1	0.926	7.71E-05
226842_at	FBXL20	0.601	3.40E-05	226149_at	SNHG11	0.647	2.87E-05
232412_at	FBXL20	0.620	5.76E-05	225699_at	SNHG15	0.782	6.33E-05
225803_at	FBXO32	0.658	1.74E-04	229050_s_at	SNHG7	1.240	2.43E-06
225328_at	FBXO32	0.758	1.19E-02	225220_at	SNHG8	0.875	6.48E-05
223493_at	FBXO4	0.608	8.42E-05	225249_at	SPPL2B	0.603	3.53E-05
203240_at	FCGBP	1.022	1.04E-05	221769_at	SPSB3	0.649	5.00E-05
200894_s_at	FKBP4	-0.703	2.95E-05	46256_at	SPSB3	0.774	1.66E-05
200895_s_at	FKBP4	-0.593	7.01E-05	209218_at	SQLE	-0.846	6.44E-05
228832_at	FLJ20021	0.639	5.11E-04	213577_at	SQLE	-0.827	2.33E-04
225899_x_at	FLJ45340	0.616	1.66E-05	213562_s_at	SQLE	-0.806	1.08E-04
219889_at	FRAT1	0.653	2.71E-04	241734_at	SRFBP1	-0.693	5.14E-05
209414_at	FZR1	0.595	2.66E-05	201516_at	SRM	-0.660	6.28E-05
224741_x_at	GAS5	0.615	2.65E-04	222532_at	SRPRB	-0.657	8.03E-05
224841_x_at	GAS5	0.615	1.59E-04	208863_s_at	SRSF1	-0.672	3.68E-05
227321_at	GATS	0.752	6.74E-05	227164_at	SRSF1	-0.670	7.14E-05
210589_s_at	GBAP1	0.733	2.29E-05	225636_at	STAT2	0.823	5.47E-06
212244_at	GCOM1	0.597	2.96E-05	227179_at	STAU2	-0.863	3.05E-05
236583_at	GIMAP1	0.708	2.64E-04	212009_s_at	STIP1	-0.598	1.43E-04
1552318_at	GIMAP1	0.900	1.15E-05	213330_s_at	STIP1	-0.596	3.02E-04
219777_at	GIMAP6	0.598	7.99E-05	204090_at	STK19	0.599	4.63E-05
205929_at	GPA33	0.596	6.97E-04	226850_at	SUMF1	0.624	4.17E-05
224634_at	GPATCH4	-0.744	1.80E-05	212144_at	SUN2	0.789	4.55E-06
224632_at	GPATCH4	-0.627	2.85E-05	237304_at	SYCE2	0.712	2.27E-05
225058_at	GPR108	0.671	9.90E-05	202553_s_at	SYF2	0.606	2.29E-05
212432_at	GRPEL1	-0.613	4.96E-05	209447_at	SYNE1	0.613	6.78E-05
218238_at	GTPBP4	-0.648	3.44E-05	1556176_at	TAF8	0.612	1.84E-04
220577_at	GVINP1	0.780	8.65E-04	1556178_x_at	TAF8	0.629	3.40E-05
207361_at	HBP1	0.780	3.83E-06	205486_at	TESK2	0.876	1.94E-05
209102_s_at	HBP1	1.015	1.96E-06	219724_s_at	TESPA1	0.590	7.75E-05
1559050_at	HCG27	0.591	8.60E-04	241367_at	TEX19	0.673	4.63E-05
202455_at	HDAC5	0.749	2.96E-05	206649_s_at	TFE3	0.602	9.89E-05
218603_at	HECA	0.708	2.02E-05	212457_at	TFE3	0.723	1.82E-05
220387_s_at	HHLA3	0.612	9.64E-05	215009_s_at	THAP9-AS1	0.662	1.50E-04
209398_at	HIST1H1C	0.659	1.93E-04	205217_at	TIMM8A	-0.683	9.40E-06
215071_s_at	HIST1H2AC	1.063	6.11E-05	225487_at	TMEM18	0.653	9.23E-06

ProbeSet	GeneSymbol	logFC	adj.P.Val	ProbeSet	GeneSymbol	logFC	adj.P.Val
207156_at	HIST1H2AG	0.736	3.41E-04	228054_at	TMEM44	0.635	1.92E-05
210387_at	HIST1H2BC	0.645	1.04E-02	227936_at	TMEM68	-0.597	5.56E-05
206110_at	HIST1H3H	0.938	1.17E-05	238429_at	TMEM71	0.587	7.48E-04
214290_s_at	HIST2H2AA3	0.630	1.43E-03	237863_at	TMPO	0.649	6.33E-05
202934_at	HK2	-0.774	3.14E-05	201581_at	TMX4	0.630	2.33E-04
200905_x_at	HLA-E	0.623	4.63E-05	227420_at	TNFAIP8L1	0.708	2.38E-05
200904_at	HLA-E	1.186	4.14E-06	228053_s_at	TOMM5	-0.591	1.15E-04
205822_s_at	HMGCS1	-1.103	2.42E-04	204083_s_at	TPM2	0.666	1.84E-04
221750_at	HMGCS1	-1.003	5.15E-04	200743_s_at	TPP1	0.609	1.26E-05
214280_x_at	HNRNPA1	0.886	7.92E-06	213261_at	TRANK1	0.706	7.77E-05
213359_at	HNRNPDL	0.886	3.68E-05	219351_at	TRAPPC2	0.718	2.17E-05
1554678_s_at	HNRPDL	-0.593	1.88E-04	238628_s_at	TRAPPC2L	0.623	1.28E-04
209067_s_at	HNRPDL	-0.590	4.86E-05	1554250_s_at	TRIM73	0.619	4.86E-05
1556097_at	HOMER2	0.633	1.55E-02	1552332_at	TRIOBP	0.614	2.65E-04
219020_at	HS1BP3	0.620	4.35E-04	233970_s_at	TRMT6	-0.657	1.22E-05
217989_at	HSD17B11	0.636	1.58E-05	210055_at	TSHR	0.753	3.83E-06
219113_x_at	HSD17B14	0.691	5.03E-04	244189_at	TTC28-AS1	0.682	3.16E-05
224497_x_at	HSD17B14	0.717	6.90E-05	224912_at	TTC7A	0.674	8.16E-05
228713_s_at	HSD17B14	0.729	4.33E-05	203894_at	TUBG2	0.637	5.81E-05
216449_x_at	HSP90B1	-0.647	7.53E-04	1554086_at	TUBGCP3	-0.609	2.84E-04
200598_s_at	HSP90B1	-0.672	4.21E-04	206828_at	TXK	0.773	6.92E-04
200800_s_at	HSPA1A	-0.816	2.38E-03	218837_s_at	UBE2D4	-0.685	3.39E-05
202581_at	HSPA1A	-0.759	3.05E-03	217799_x_at	UBE2H	0.603	2.79E-05
211016_x_at	HSPA4	-0.757	2.81E-05	222421_at	UBE2H	0.656	3.86E-05
208815_x_at	HSPA4	-0.738	3.87E-05	219960_s_at	UCHL5	-0.644	4.63E-05
211015_s_at	HSPA4	-0.730	7.20E-05	223141_at	UCK1	0.686	2.42E-05
211936_at	HSPA5	-1.213	6.78E-05	208998_at	UCP2	0.610	4.24E-05
241716_at	HSPD1	-0.781	5.93E-04	208997_s_at	UCP2	0.644	5.56E-05
208744_x_at	HSPH1	-0.640	5.73E-04	202365_at	UNC119B	0.678	9.27E-06
206976_s_at	HSPH1	-0.618	3.05E-04	231008_at	UNC5CL	0.613	6.93E-03
236629_at	IBA57	0.599	2.96E-05	229908_s_at	UNKL	0.760	1.22E-05
204569_at	ICK	0.804	2.43E-06	218757_s_at	UPF3B	0.808	1.04E-05
202070_s_at	IDH3A	-0.635	7.99E-05	244293_at	UQCRCB	0.723	5.48E-05
202069_s_at	IDH3A	-0.623	4.96E-05	205284_at	URB2	-0.672	2.42E-05
204615_x_at	IDI1	-0.781	6.23E-05	228050_at	UTP15	-0.766	2.00E-05
208881_x_at	IDI1	-0.759	6.69E-05	203721_s_at	UTP18	-0.605	2.45E-05
226757_at	IFIT2	0.777	3.68E-05	213480_at	VAMP4	0.945	1.80E-05
202105_at	IGBP1	0.612	1.34E-05	210512_s_at	VEGFA	-0.764	3.13E-04
209341_s_at	IKBKB	0.619	2.01E-05	209950_s_at	VILL	0.991	3.70E-05
205992_s_at	IL15	0.639	6.05E-05	203292_s_at	VPS11	0.605	1.02E-04
48825_at	ING4	0.793	2.38E-05	207628_s_at	WBSCR22	-0.588	2.42E-05
218234_at	ING4	0.919	6.05E-05	214662_at	WDR43	-0.656	3.34E-05
202782_s_at	INPP5K	0.653	1.92E-05	209217_s_at	WDR45	0.772	1.64E-05
202781_s_at	INPP5K	0.693	1.22E-05	209216_at	WDR45	0.845	5.73E-06
223165_s_at	IP6K2	0.895	1.10E-05	201421_s_at	WDR77	-0.722	1.08E-05
208436_s_at	IRF7	0.780	2.65E-05	201420_s_at	WDR77	-0.659	3.53E-05
203882_at	IRF9	0.597	5.76E-05	222777_s_at	WHSC1	0.690	1.06E-05
209185_s_at	IRS2	0.831	1.56E-04	222778_s_at	WHSC1	0.917	3.83E-06
212722_s_at	JMJD6	-0.610	1.79E-04	226986_at	WIPI2	0.735	6.53E-06
230388_s_at	KANSL1-AS1	0.609	2.11E-04	200670_at	XBP1	-0.659	1.07E-03
224318_s_at	KANSL3	0.689	1.08E-05	223055_s_at	XPO5	-0.684	4.17E-05
207237_at	KCNA3	0.628	1.31E-04	216338_s_at	YIPF3	0.642	3.31E-05
226246_at	KCTD1	0.606	1.61E-02	213996_at	YPEL1	0.766	1.02E-05

ProbeSet	GeneSymbol	logFC	adj.P.Val	ProbeSet	GeneSymbol	logFC	adj.P.Val
226245_at	KCTD1	0.663	3.56E-03	228296_at	YPEL1	0.865	3.70E-05
213474_at	KCTD7	0.674	1.08E-05	228788_at	YPEL1	1.079	3.67E-06
203712_at	KIAA0020	-0.801	5.47E-06	227020_at	YPEL2	0.965	5.84E-04
202386_s_at	KIAA0430	0.684	2.79E-05	235916_at	YPEL4	0.604	2.93E-03
1561666_a_at	KIAA1908	0.608	2.79E-04	222408_s_at	YPEL5	0.966	2.07E-06
219371_s_at	KLF2	1.051	8.16E-04	217783_s_at	YPEL5	1.099	1.98E-06
221986_s_at	KLHL24	0.740	2.05E-04	222703_s_at	YRDC	-0.608	1.99E-05
221985_at	KLHL24	0.842	1.02E-05	227049_at	ZADH2	0.596	3.87E-05
242088_at	KLHL24	0.870	1.04E-05	205383_s_at	ZBTB20	0.681	3.18E-05
226158_at	KLHL24	1.320	3.67E-06	218348_s_at	ZC3H7A	0.603	1.29E-04
1555815_a_at	L3MBTL2	-0.601	8.42E-05	226897_s_at	ZC3H7A	0.605	1.09E-04
204078_at	LEPREL4	0.604	1.25E-03	226650_at	ZFAND2A	0.793	1.80E-05
207170_s_at	LETMD1	0.859	7.71E-06	239937_at	ZNF207	0.640	1.09E-04
215434_x_at	LOC100288142	0.627	3.27E-04	232753_at	ZNF346	0.734	2.00E-05
1556242_a_at	LOC100310756	0.719	1.06E-04	213130_at	ZNF473	0.650	3.40E-05
228275_at	LOC100505687	0.653	2.63E-04	226676_at	ZNF521	0.651	2.73E-04
236798_at	LOC100505687	0.721	2.85E-05	226677_at	ZNF521	0.674	7.38E-04
238898_at	LOC100505730	-0.651	1.71E-04	206583_at	ZNF673	0.633	1.87E-05
1558906_a_at	LOC100505783	0.834	1.11E-04	213527_s_at	ZNF688	0.591	6.72E-05
224767_at	LOC100506548	1.355	3.67E-06	1558754_at	ZNF763	0.695	8.54E-05
224763_at	LOC100506548	1.387	6.74E-06	213444_at	ZNF862	0.594	5.48E-05
236075_s_at	LOC100506676	-0.826	1.35E-05	226835_s_at	ZNFX1-AS1	0.603	2.76E-04
236611_at	LOC100506676	-0.712	3.64E-05	230209_at	ZXDC	0.604	3.05E-04
200831_s_at	LOC100652751	-0.888	1.58E-05				