



Estudi de l'estat mutacional dels gens de les immunoglobulines i heterogeneïtat clínic biològica del limfoma de les cèl·lules del mantell

Alba Navarro López

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

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

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

DEPARTAMENT D'ANATOMIA PATOLÒGICA, FARMACOLOGIA I
MICROBIOLOGIA
FACULTAT DE MEDICINA
UNIVERSITAT DE BARCELONA

PROGRAMA DE DOCTORAT
MEDICINA



ESTUDI DE L'ESTAT MUTACIONAL DELS GENS DE LES
IMMUNOGLOBULINES I HETEROGENEÏTAT CLÍNICO BIOLÒGICA DEL
LIMFOMA DE CÈL·LULES DEL MANTELL

Tesi presentada per **Alba Navarro López**
per optar al grau de **Doctora en Medicina**

Director: **Prof. Elias Campo Güerri**
Codirectora: **Dra. Sílvia Beà Bobet**

Barcelona, 2012

Els treballs realitzats en aquesta tesi han estat finançats amb els següents fons:



- Ministeri de Ciència i Innovació “Formació de Personal Investigador” BES-2007-16330 (Beca predoctoral personal).
- Ministeri de Ciència i Innovació, Projecte SAF 2008-03630 (Projecte Dr. Campo).
- Institut de Salut Carlos III, Projecte FIS 2008 (PI08/0077, projecte Dra. Beà).
- “Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer” (RTICC) RD06/0020/0039 (Grup Dr. Campo).
- Fons Europeu de Desenvolupament Regional (FEDER). Unió Europea. “Una manera de fer Europa”.

Els estudis d'aquesta tesi han generat les següents publicacions:

1. **Navarro A**, Clot G, Royo C, Jares P, Hadzidimitriou A, Agathangelidis A, Bikos V, Darzentas N, Papadaki T, Salaverria I, Pinyol P, Puig X, Palomero J, Vegliante M.C, Amador V, Martinez-Trillos A, Stefancikova L, Wiestner A, Wilson W, Pott C, Calasanz MJ, Trim N, Erber W, Sander B, Ott G, Rosenwald A, Colomer D, Giné E, Siebert R, Lopez-Guillermo A, Stamatopoulos K, Beà S*, Campo E*. Molecular subsets of mantle cell lymphoma defined by the *IGHV* mutational status and SOX11 expression have distinct biological and clinical features. **Accepted at a Cancer Research. Agost 2012.**
2. Royo C*, **Navarro A***, Clot G, Salaverria I, Giné E, Jares P, Colomer D, Wiestner A, Wilson WH, Vegliante MC, Fernandez V, Hartmann E, Trim N, Erber WN, Swerdlow, Klapper W, Dyer M, Vargas M, Ott G, Rosenwald A, Siebert R, Lopez-Guillermo A, Campo E[#], Bea S[#]. Non-Nodal Mantle Cell Lymphoma type is a Specific Biological and Clinical Subtype of the disease. **Leukemia. 2012 Mar 19. doi: 10.1038/leu.2012.72**
3. **Navarro A**, Beà S, Fernández V, Prieto M, Salaverria I, Jares P, Hartmann E, Mozos A, López-Guillermo A, Villamor N, Colomer D, Puig X, Ott G, Solé F, Serrano S, Rosenwald A, Campo E, Hernández L. MicroRNA Expression, Chromosomal Alterations, and Immunoglobulin Variable Heavy Chain Hypermutations in Mantle Cell Lymphomas. **Cancer Res. 2009 Sep 1;69(17):7071-8.**

*Els dos autors han contribuït igualment en aquesta publicació.

[#] Els dos autors són co-seniors en aquesta publicació.

Els estudis d'aquesta tesi han generat les següents revisions:

1. **Navarro A**, Royo C, Hernández L, Jares P, Campo E. Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: new perspectives and challenges with clinical implications. **Semin Hematol. 2011 Jul;48(3):155-65.**
2. **Navarro A**, Campo E. New perspectives and challenges in the understanding of mantle cell lymphoma. **Ann Oncol. June 1, 2011 22:iv32-iv35.**

Les publicacions i col·laboracions associades a aquesta tesi són:

1. Xargay S, López-Guerra M, Saborit-Villarroya I, Rosich L, **Navarro A**, Montraveta A, Pérez-Galán P, Roué G, Campo E, Colomer D. Sorafenib inhibits cell migration and stroma-mediated bortezomib resistance by interfering BCR signaling and protein translation in mantle cell lymphoma. **Enviat a Cancer Research, agost 2012.**
2. Hartmann E, Beà S, **Navarro A**, Trapp V, Campo E, Ott G, Rosenwald A. Increased tumor cell proliferation in mantle cell lymphoma is associated with elevated IMP3 protein expression. **Mod Pathol. May 2012. doi:10.1038/modpathol.2012.84.**
3. López C, Delgado J, Costa D, Conde L, Ghita G, Villamor N, **Navarro A**, Cazorla M, Gómez C, Arias A, Muñoz, Baumann T, Rozman M, Aymerich M, Colomer D, Cobo, F, Campo E, López-Guillermo A, Montserrat E, Carrió A. Different distribution of NOTCH1 mutations in chronic lymphocytic leukemia with isolated trisomy 12 or associated with other chromosomal alterations. **Genes, Chromosome and Cancer. Epub 2012 May 23. 2012 Sep;51(9):881-9. doi: 10.1002/gcc.21972.**
4. López C, Baumann T, Costa D, López-Guerra M, **Navarro A**, Gómez C, Arias A, Muñoz C, Rozman M, Villamor N, Colomer D, Montserrat E, Campo E, Carrió A. A new genetic abnormality leading to TP53 gene deletion in chronic lymphocytic leukaemia. **Br J Haematol. 2012 Mar;156(5):612-8.**
5. Hadzidimitriou A, Agathangelidis A, Darzentas N, Murray F, Delfau-Larue MH, Pedersen LB, **Navarro A**, Dagklis A, Rombout P, Beldjord K, Kolstad A, Dreyling MH, Anagnostopoulos A, Tsaftaris A, Mavragani-Tsipidou P, Rosenwald A, Ponzoni M, Groenen P, Ghia P, Sander B, Papadaki T, Campo E, Geisler C, Rosenquist R, Davi F, Pott C, Stamatopoulos K. Is there a role for antigen selection in mantle cell lymphoma? Immunogenetic support from a series of 807 cases. **Blood. 2011 Sep 15;118(11):3088-95.**

6. Enjuanes A, Fernández V, Hernández L, **Navarro A**, Beà S, Pinyol M, López-Guillermo A, Rosenwald A, Ott G, Campo E, Jares P. Identification of methylated genes associated with aggressive clinicopathological features in mantle cell lymphoma. **PLoS One**. 2011;**6(5):e19736**.
7. Fernández V, Salamero O, Espinet B, Solé F, Royo C, **Navarro A**, Camacho F, Beà S, Hartmann E, Amador V, Hernández L, Agostinelli C, Sargent RL, Rozman M, Aymerich M, Colomer D, Villamor N, Swerdlow SH, Pileri SA, Bosch F, Piris MA, Montserrat E, Ott G, Rosenwald A, López-Guillermo A, Jares P, Serrano S, Campo E. Genomic and gene expression profiling defines indolent forms of mantle cell lymphoma. **Cancer Res**. 2010 Feb 15;**70(4):1408-18**.
8. Bea S, Salaverria I, Armengol L, Pinyol M, Fernandez V, Hartmann EM, Jares P, Amador V, Hernandez L, **Navarro A**, Ott G, Rosenwal A, Estivill X, Campo E. Uniparental disomies, homozygous deletions, amplifications and target genes in mantle cell lymphoma revealed by integrative high-resolution whole genome profiling. **Blood**. 2009 Mar 26;**113(13):3059-69**.
9. Martelli MP, Sozzi G, Hernandez L, Pettirossi V, **Navarro A**, Conte D, Gasparini P, Perrone F, Modena P, Pastorino U, Carbone A, Fabbri A, Sidoni A, Nakamura S, Gambacorta M, Fernández PL, Ramirez J, Chan JK, Grigioni WF, Campo E, Pileri SA, Falini B. EML4-ALK rearrangement in non-small cell lung cancer and non-tumor lung tissues. **Am J Pathol**. 2009 Feb;**174(2):661-70**

Les publicacions com a membre del Consorci Internacional del Genoma del Càncer per l'estudi de la leucèmia limfàtica crònica (ICGC-CLL), són les següents:

1. Kulis M, Heath S, Bibikova M, Queirós A, **Navarro A**, Clot G, Martínez-Trillos A, Brun-Heath I, Pinyol M, Barberán-Soler S, Pappas P, Jares P, Beà S, Rico D, Ecker S, Ho V, Klotzle B, Castellano G, Hernández L, Conde L, López-Guerra M, Colomer D, Villamor N, Aymerich M, Rozman M, Bayes M, Gut M, Quesada V, Puente X.S, Pisano D.G, Valencia A, López-Guillermo A, Gut I, López-Otín C, Campo E & Martín-Subero J.I. Integrative whole-genome epigenomic analysis reveals widespread gene body DNA hypomethylation with functional and clinical impact in chronic lymphocytic leukemia. Acceptat a **Nature Genetics**, agost 2012.
2. Quesada V, Conde L, Villamor N, Ordóñez GR, Jares P, Bassaganyas L, Ramsay AJ, Beà S, Pinyol M, Martínez-Trillos A, López-Guerra M, Colomer D, **Navarro A**, Baumann T, Aymerich M, Rozman M, Delgado J, Giné E, Hernández JM, González-Díaz M, Puente DA, Velasco G, Freije JM, Tubío JM, Royo R, Gelpí JL, Orozco M, Pisano DG, Zamora J, Vázquez M, Valencia A, Himmelbauer H, Bayés M, Heath S, Gut M, Gut I, Estivill X, López-Guillermo A, Puente XS, Campo E, López-Otín C. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. **Nat Genet.** 2011 Dec 11;44(1):47-52.
3. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordóñez GR, Villamor N, Escaramis G, Jares P, Beà S, González-Díaz M, Bassaganyas L, Baumann T, Juan M, López-Guerra M, Colomer D, Tubío JM, López C, **Navarro A**, Tornador C, Aymerich M, Rozman M, Hernández JM, Puente DA, Freije JM, Velasco G, Gutiérrez-Fernández A, Costa D, Carrió A, Guijarro S, Enjuanes A, Hernández L, Yagüe J, Nicolás P, Romeo-Casabona CM, Himmelbauer H, Castillo E, Dohm JC, de Sanjosé S, Piris MA, de Alava E, San Miguel J, Royo R, Gelpí JL, Torrents D, Orozco M, Pisano DG, Valencia A, Guigó R, Bayés M, Heath S, Gut M, Klatt P, Marshall J, Raine K, Stebbings LA, Futreal PA, Stratton MR, Campbell PJ, Gut I, López-Guillermo A, Estivill X, Montserrat E, López-Otín C, Campo E. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. **Nature.** 2011 Jun 5;475(7354):101-5.

Al **Toni**, el meu pare.
“Perquè jo sóc una mica de tu,
i tu una mica de mi.”

ÍNDEX

1. INTRODUCCIÓ 27

1.1	Sistema immunitari i resposta immune	29
1.1.1	Estructura i cèl·lules del sistema immune	29
1.1.2	La resposta immune	30
1.1.3	Maduració i desenvolupament dels limfòcits B	31
1.1.4	La reacció del centre germinal	33
1.2	Immunoglobulines	36
1.2.1	Immunoglobulines de les cèl·lules B	36
1.2.2	Estructura dels gens de les IG	37
1.2.3	Organització del locus de les IG	39
1.2.4	Funció i reordenament de les IG. Mecanismes de generació de diversitat	40
1.2.5	Repertori de les IG de les cèl·lules B normals i neoplàsies limfoides	43
1.3	Neoplàsies limfoides	45
1.3.1	Classificació	45
1.4	Limfoma de cèl·lules del mantell	48
1.4.1	Morfologia i immunofenotip	48
1.4.2	Període de latència	50
1.4.3	Genètica	50
1.4.4	Vies patogenètiques implicades	52
1.4.5	Factors de predicció i pronòstic	53
1.4.6	Tractament	54
1.4.7	Formes indolents	56

HETEROGENEÏTAT EN EL LCM

1.5	Immunoglobulines en LCM	58
1.5.1	Evidència d'estimulació antigènica	58
1.6	Expressió de SOX11 en LCM	59
1.6.1	Limfoma de cèl·lules del mantell ciclina D1 negatiu	59
1.6.2	<i>SOX11</i> : descripció i funció	60
1.6.3	<i>SOX11</i> en oncògenesi i neoplàsies limfoides	61

1.7	MicroRNAs en LCM	63
1.7.1	Biogènesi dels microRNAs.....	63
1.7.2	Mecanismes d'acció dels microRNAs.....	65
1.7.3	MicroRNAs i oncogènesi.....	66
1.7.4	MicroRNAs i neoplàsies limfoides.....	68
2.	HIPÒTESI I OBJECTIUS	71
<hr/>		
2.1	Hipòtesi	73
2.2	Objectius	73
3.	MATERIAL I MÈTODES	75
<hr/>		
3.1	Anàlisi d'expressió de gens	77
3.1.1	Reacció en cadena de la polimerasa.....	77
3.1.2	PCR quantitativa a temps real.....	77
3.2	Tècniques d'anàlisi massiu	81
3.2.1	Hibridació genòmica comparada (CGH).....	81
3.2.2	Arrays de còpia gènica (SNP 6.0 Affymetrix).....	82
3.2.3	Arrays d'expressió gènica.....	83
3.3	Estudi de l'expressió proteica	86
3.3.1	Immunohistoquímica (IHQ).....	86
3.4	Anàlisi cel·lular	88
3.4.1	Citometria de flux.....	88
4.	RESULTATS	91
<hr/>		
	ARTICLE 1: Acceptat a Cancer Research. Agost del 2012.....	93
	ARTICLE 2: Leukemia. Març del 2012. 19. Doi: 10.1038/leu.2012.7.....	121
	ARTICLE 3: Cancer Research. Setembre del 2009.1;69(17):7071-8.....	143
	REVISIÓ 1: Seminars in Hematology. Juliol del 2011. 48(3):155-65.....	155
	REVISIÓ 2: Annals of Oncology. Juny del 2011 22:iv32-iv35.....	169

5. DISCUSSIÓ	177
<hr/>	
6. CONCLUSIONS	195
<hr/>	
7. ANNEXES	199
<hr/>	
Annex 1. Enviat a Cancer Research. Agost 2012.....	201
Annex 2. Modern Pathology. Maig 2012 doi:10.1038/modpathol.2012.84.....	202
Annex 3. Genes, Chromosome and Cancer. Epub 2012 May 23. 2012 Sep;51(9):881-9.	203
Annex 4. Br J Haematol. 2012 Març;156(5):612-8.....	204
Annex 5. Blood. 2011 Sep 15;118(11):3088-95.....	204
Annex 6. PLoS One. 2011;6(5):e19736.	206
Annex 7. Cancer Res. 2010 Feb 15;70(4):1408-18.	207
Annex 8. Blood. 2009 Març 26;113(13):3059-69.	208
Annex 9. Am J Pathol. 2009 Feb;174(2):661-70.....	209
Annex 10. Acceptat a Nature Genetics. Agost 2012.	210
Annex 11. Nat Genet. 2011 Des 11;44(1):47-52.....	211
Annex 12. Nature. 2011 Jun 5;475(7354):101-5.....	212
8. BIBLIOGRAFIA	215
<hr/>	
9. GLOSSARI I ANGLICISMES	243
<hr/>	

AGRAÏMENTS

Per fi! És impossible descriure amb paraules les emocions que un sent quan arriba el moment d'escriure aquest capítol de la tesi. He de reconèixer que algunes vegades he dubtat de l'arribada d'aquest moment tant somiat, de poder veure la feina dels últims anys plasmada en unes quantes línies. Si això és així, és perquè molts m'heu ajudat a fer-ho possible, és per això que qualsevol paraula queda curta en fer l'intent d'agrair a totes les persones la seva col·laboració en l'elaboració d'aquesta tesi. M'hagués agradat no escriure uns agraïments típics i tòpics però a la vegada penso que cadascun de vosaltres us mereixeu el vostre espai en aquest apartat.

En primer lloc vull donar les gràcies a tots aquells que heu aguantat el meu dia a dia al lab (sé que no sóc fàcil). A les tècnics amb les mans d'or. A la **Miriam**, per aguantar l'efecte lapa que li vaig fer els primers dies i per deixar-me abusar de tu amb feinetes tontes. A la **Sara**, per compartir amb mi els fenòmens paranormals de les PCRs i ensenyar-me que la ciència no és exacta, que hi ha coses que no s'expliquen. A la **Noe**, per estar sempre disposada a ajudar amb qualsevol cosa.

A les ovelles joves del corral, tots el becaris que han anat entrant i que m'han fet adonar de que el temps passa massa ràpid. A la **Mariella** i la **Jara**, el “duo dinámico”, per les seves ganes de treballar i voltar pel món. A la **Marta** i l'**Ana**, gràcies per aportar el toc multicultural al lab. Al **Robert**, per aportar aire fresc, per l'ordre dins del desordre i per les seves ganes de menjar-se el món. A la **Carla**, per tenir sempre alguna batalleta per explicar. Al **Guillem**, per sobreviure als seus primers mesos a la unitat de genòmica i per la paciència davant la meva dificultat amb l'estadística. A la **Cris**, per seguir-me els passos i no fer-me sentir tant sola. Per compartir taula, poiata, habitacions dels congressos, viatges de tren i papers. Per aguantar-me les rallades en els moments de “baixon”, per donar-me una lliçó quan el Ferran encara era una mongeta.

Als “grans” del lab, al **Lluís** per acollir-me a la meva entrada i deixar-me participar i aprendre les primeres coses dels miR. A la **Virginia** per compartir la desesperació davant de llistes i llistes de gens, arrays i fluidigms. A l'alemanya, la **Iti**, per fer-me sentir que no havia passat el temps quan vas tornar del teu post-doc, per fer-me prendre la decisió de començar a escriure la tesi. A l'**Iñaki** per la seva motivació i per descobrir la doble hèlix cada dia. A la **Maite**, per deixar-me a la Sara i compartir els misteris de

les taqs. I finalment a la **Laura Conde**, la desertora. Gràcies per totes les converses, pels consells i els ànims que m'has donat, per entendre'm en molts moments i per intentar fer-me creure que sóc algú.

A tots els integrants de la Unitat de Genòmica, perquè l'enrenou que s'hi genera em fa sentir com a casa. A la **Montsina**, per aquesta mala hòstia i aquest "me la clava" que m'espanta, però sempre disposada a buscar-me les mostres. A la **Laura Pla**, per deixar-me heretar la poiata del 302 i per aquest efecte camaleó que només tu saps fer (tots som "raros"). A l'**Helena**, per donar-me la lliçó de que els divendres no es pot fer experimental, pel vici de comprar calces i per ser igual (o més) "basta" que jo. A l'**Anna Enjuanes**, pel seu tarannà dolç i tranquil, per mantenir-te al marge del parell de bruixes (Silvia i Magda) que t'envolta. A la **Magda**, pels seus crits i les seves queixes. Perquè a vegades em fas por, però sé que ets massa bona persona. Per aquesta capacitat de posar-te seria quan el moment ho requereix, per escoltar-me i preocupar-te per mi i per ensenyar-me que la merda sempre cau cap avall. Al **Pedro**, per ser l'únic madridista declarat de la plantilla, tot i que en el fons penso que portes sang culé, però et fas promou per portar-me la contraria. Per descobrir-me el món dels arrays, per saber-ne tant i tenir la paciència per explicar-m'ho. Per preocupar-te per mi i per la meva cama. Aviat estaré a punt per un partit de pàdel.

A les nenes del Banc de Tumors, **Laura, Mònica, Lourdes, Raquel i Àngela**, per compartir esmorzars, dinars, penes i alegries, i per tenir la paciència de treballar sempre amb urgència.

A tota la gent de la Unitat d'Hematologia de l'Hospital Clínic. A les nenes de l'ICGC, per tenir la capacitat d'aguantar el meu desordre de mostres i canvis de protocol, a la **Neus Villamor** i la **Marta Aymerich**, per resoldre'm tots els dubtes en citometria i poblacions tumorals. A la **Dolors Colomer** i a tota la gent del seu grup, per compartir mostres i estar sempre disposats a col·laborar amb nosaltres. A l'**Alejandra**, per acceptar passar-me qualsevol mostra a qualsevol hora i per la rapidesa en la búsqueda d'històries clíniques. A l'**Armando** i a la **Eva Giné**, per no negar-se mai a participar amb els nostres projectes. Gràcies per ser tant crítics i donar una altra visió als nostres treballs.

Als nostres col·laboradors grecs de l'EKETA. A l'**Anastasia**, l'**Andreas**, el **Vasilis**, el **Nikos** i l'adoptat, l'**Alex**. Per acollir-me amb els braços oberts i fer-me sentir com a casa. Per introduir-me a la cultura grega del frapé i el malaka. Per protegir-me dels ultres de l'ARIS i ensenyar-me platges paradisiàques. Per fer tant senzill el món de les immunoglobulines. Al **Kostas Stamatopoulos** per permetre'm viure aquella experiència, per tractar-me tant bé i seguir treballant amb nosaltres des de la distància. Ho sento, no era la meva intenció acabar d'enfonsar el país! Ευχαριστίες, μια ευχαρίστηση που σας συνάντησα!

Als dos directors d'aquesta tesi, perquè sense el seu esforç i la seva dedicació mai hauria estat possible. A la **Sílvia** (la Ramoneta) per diagnosticar-me la dislèxia entre la p i la q, l'esquerra i la dreta, els números en general i els colors. Per enviar-me aquests mails que em fan tanta "risa" i per demostrar-me aquesta gran habilitat de memoritzar números i llistes. Però sobretot mil gràcies per fer-te responsable de mi, per preocupar-te per tot, per haver-me dedicat més hores de les que has tingut i per ajudar-me a tirar-ho tot endavant. Gràcies Wt!. A l'**Elies** (l'amo de tots) per obrir-me les portes del seu gran món, per demostrar-me que encara queda gent capaç de controlar mil coses, de respondre mails a hores intempestives, de relacionar lo irrelacionable i de captar el mínim detall. Per ser tant humil i humà. Gràcies per involucrar-me en els teus projectes, per la paciència i la dedicació.

Als biotecnòlegs que vaig conèixer al meu pas per la Universitat Autònoma de Barcelona, el **Joan**, el **Roger**, la **Íngrid**, la **Cinta**, la **Paula**, l'**Alberto**, la **Bàrbara**, el **Jofre**, el **Ferran** i el **Pep**. Per compartir amb mi els 4 anys de carrera, tant les interminables hores de pràctiques com les glorioses hores al bar. Pels posteriors sopars i trobades per explicar-nos la vida i compartir experiències, i per deixar que aquesta amistat hagi durat fins a dia d'avui. I en especial a la **Jone**, per tot lo anterior i sobretot per fer-me costat en el moment més difícil de la meva vida. Gràcies a tots.

A la gent del futbol, per deixar-me alliberar les tensions acumulades durant la setmana, per deixar-me fer super-xuts als entrenos, per les "rises" amb les cròniques de la jornada, les òperes al vestuari, les calçotades i les festes en general. Per deixar-se la pell al camp, però no guanyar mai res. Us he trobat a faltar aquests últims mesos.

A la **Montse**. Per compartir moltes de les experiències que m'han fet ser la persona d'avui dia. Per aïllar-me del meu món i donar una mica d'emoció a la meva vida. Pels cafès dels divendres. Per la paciència, les confessions i la companyia. Per ser-hi sempre i no fallar mai. Gràcies per tot Montse!

Però si una cosa tinc clara després de tots aquests anys, és que sóc on sóc pel suport incondicional de la meva família. A la meva família política, per aquesta confiança a cegues que sempre m'heu demostrat. I sobretot als de casa. A l'**Arnau**, el meu germà, l'astronauta-judoca que aniria a la lluna a plantar enciams. Per haver-me aguantat durant tants anys, per no haver desistit i per no haver marxat mai del meu costat. A la meva mare, la **Pilar**, per ensenyar-me què vol dir lluitar, per demostrar-me que sempre queden forces per tirar endavant. Per ser el meu referent d'esforç i superació. Per fer-me costat i ser-hi sempre. Gràcies per no abandonar mai, mare. Al **Toni**, el meu pare, perquè tot i marxar just començar aquesta travessia sempre has estat present, perquè sé que, en silenci, estaries traient pit.

A l'**Arnau**, per llevar-te cada dia al meu costat, per la paciència i els ànims, per donar-me motius per seguir tirant endavant, per amenitzar-me el viatge i confiar en mi. Gràcies.

...a tots, infinites GRÀCIES per fer-ho possible!

ABREVIATURES

AID	Citidina deaminasa activada (de l'anglès <i>Activation Induced Cytidine deaminase</i>)
ATM	Gen mutat de l'Ataxia-telangiectasia (de l'anglès <i>Ataxia-Telangiectasia Mutated gene</i>)
BcR	Receptor de les cèl·lules B (de l'anglès <i>B-cell receptor</i>)
CCND1	gen de la Ciclina D1
CDF	Cèl·lules Dendrítiques Fol·liculars
CDR	Regió determinant de la complementarietat (de l'anglès <i>Complementary Determing Region</i>)
CG	Centre Germinal
CGH	Hibridació genòmica comparada (de l'anglès <i>Comparative Genomic Hybridization</i>)
CHOP	Ciclofosfamida, Hidroxidaunomicina (Doxorrubicina), Oncovin (Vincristina) i Prednisona
CSR	Recombinació del canvi d'isotip (de l'anglès <i>Class Switch Recombination</i>)
Ct	Cicle llindar (de l'anglès <i>Cycle Threshold</i>)
DAVID	de l'anglès <i>Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery</i>
DLBCL	Limfoma B difús de cèl·lules grans (de l'anglès <i>Diffuse Large B-cell Lymphoma</i>)
DNA	Àcid desoxirribonucleic (de l'anglès <i>deoxyribonucleic acid</i>)
FDA	de l'anglès <i>Food and Drug Administration</i>
FDR	Taxa de falsos descobriments (de l'anglès <i>False Discovery Rate</i>)
FISH	Hibridació <i>in situ</i> fluorescent (de l'anglès <i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>)
FR	de l'anglès <i>Framework Region</i>
FT	Factor de Transcripció
GO	de l'anglès <i>Gene Ontology</i>
GSEA	de l'anglès <i>Gene Set Enrichment Analysis</i>
GST	Gen Supressor de Tumors
HCL-V	Tricoleucèmia variant (de l'anglès <i>Hairy Cell Leukemia Variant</i>)
HMG	de l'anglès <i>High Mobility Group</i>

IGHV	Gens del segment variable de la cadena pesada de les IG (de l'anglès <i>Immunoglobulin Heavy chain Variable</i>)
IGHD	Gens del segment diversitat de la cadena pesada de les IG (de l'anglès <i>Immunoglobulin Heavy chain Diversity</i>)
IGHJ	Gens del segment d'unió de la cadena pesada de les IG (de l'anglès <i>Immunoglobulin Heavy chain Joining</i>)
IGKJ	Gens del segment d'unió de la cadena lleugera kappa de les IG
IHQ	Immunohistoquímica
Kb	Quilobases (de l'anglès <i>Kilobases</i>)
LB	Limfoma de Burkitt
LLC	Leucèmia Limfàtica Crònica
LDH	Lactat Deshidrogenasa
LCM	Limfoma de Cèl·lules del Mantell
LF	Limfoma Fol·licular
LZME	Limfoma de la Zona Marginal Esplènic
MALT	Teixit limfoide associat a mucosa (de l'anglès <i>Mucosa Associated Lymphoid Tissue</i>)
MAS5	de l'anglès <i>Microarray Suite 5</i>
miRs	MicroRNAs
mTOR	de l'anglès <i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
NHL	de l'anglès <i>Non-Hodgkin Lymphoma</i>
ORF	marc obert de lectura (de l'anglès <i>Open Reading Frame</i>)
PLIER	de l'anglès <i>Probe Logarithmic Intensity Error</i>
q-PCR	PCR quantitativa a temps real (de l'anglès <i>quantitative PCR</i>)
RIN	de l'anglès <i>RNA Integrity Number</i>
RNA	Àcid ribonucleic (de l'anglès <i>Ribonucleic Acid</i>)
RMA	de l'anglès <i>Robust Multiarray Average</i>
RSS	Seqüències senyalitzadores de la recombinació (de l'anglès <i>Recombination Signal Sequence</i>)
SAM	de l'anglès <i>Significance Analysis of Microarrays</i>
SHM	Hipermutació somàtica (de l'anglès <i>Somatic Hypermutation</i>)
SNP	Polimorfisme d'un únic nucleòtid (de l'anglès <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
STA	de l'anglès <i>Specific Target Amplification</i>
TAD	Domini de transactivació (de l'anglès <i>Transactivated Domain</i>)

T-ALL	Leucèmia limfoblàstica aguda de cèl·lules T (de l'anglès <i>T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia</i>)
TdT	Transferasa desoxinucleotidil Terminal
Th	Limfòcit T cooperador (de l'anglès <i>T helper cell</i>)
UPD	Disomia uniparental (de l'anglès <i>Uniparental Disomy</i>)
UTR	Regió no traduïda (de l'anglès <i>Untranslated Region</i>)

Índex de les Figures

Per ordre d'aparició:

- Figura 1. Desencadenament de la resposta immune humoral i cel·lular.
- Figura 2. Diagrama esquemàtic dels estadis maduratius dels limfòcits B.
- Figura 3. Estructura dels ganglis limfàtics.
- Figura 4. Reacció del centre germinal dels fol·licles limfoides secundaris.
- Figura 5. Característiques i estructura dels gens de les IG.
- Figura 6. Organització molecular de la seqüència del gen de les IG en el DNA genòmic.
- Figura 7. Organització dels gens de les IG en humans.
- Figura 8. Estat del reordenament de les IG segons l'etapa de maduració dels limfòcits B.
- Figura 9. Procés de recombinació dels gens de les IG.
- Figura 10. Variants morfològiques del LCM.
- Figura 11. Sobreexpressió del gen de la CCND1 i translocació t(11;14)(q13;32).
- Figura 12. Perfil d'expressió diferencial entre LCM indolents i convencionals.
- Figura 13. Anàlisi immunohistoquímic de ciclina D1 i SOX11.
- Figura 14. Estructura de *hairpin stem-loop* del pre-miRNA.
- Figura 15. Mecanismes d'acció dels miRs.
- Figura 16. Model de participació dels miRs en càncer.
- Figura 17. Model esquemàtic del procés de la PCR.
- Figura 18. Funcionament i instrumentació de la 7900HT Fast Real Time PCR System.
- Figura 19. Etapes del procés d'amplificació i quantificació dels microRNAs.
- Figura 20. Esquema del procediment per a la realització del BioMark™ System.
- Figura 21. Funcionament de la tècnica d'immunohistoquímica.
- Figura 22. Citometria de flux.
- Figura 23. Model hipotètic dels dos subtipus moleculars de LCM.
- Figura 24. Subgrups identificats en LCM en funció de l'expressió de SOX11, l'estat mutacional de les IG i altres característiques patològiques i moleculars.

Índex de les Taules

Per ordre d'aparició:

Taula 1. Classificació actual de les neoplàsies limfoides (2008).

Taula 2. Potencials gens diana de les alteracions genètiques recurrents en LCM.

Taula 3. MiRs en càncer.

Taula 4. MiRs relacionats amb el desenvolupament tumoral de leucèmies i limfomes.

Taula 5. Anticossos utilitzats per la detecció de proteïnes mitjançant IHQ.

“No hay soledad inexpugnable.
Todos los caminos llevan al mismo punto:
a la comunicación de lo que somos.
Y es preciso atravesar la soledad y la aspereza,
la incomunicación y el silencio para llegar al recinto mágico
en que podemos danzar torpemente o cantar con melancolía;
más en esa danza o en esa canción están consumados los más antiguos ritos de la
consciencia;
la consciencia de ser hombres y de creer en un destino común.”

Pablo Neruda

1. INTRODUCCIÓ

1.1 SISTEMA IMMUNITARI I RESPOSTA IMMUNE

El **sistema immunitari** és el conjunt de mecanismes, cèl·lules, teixits i òrgans que treballen conjuntament per protegir l'organisme d'invasors externs (bactèries, virus, paràsits i fongs) causants d'infeccions. S'encarrega de prevenir les infeccions o bé de l'eliminació de patògens i cèl·lules tumorals mitjançant de la seva identificació. Es tracta d'un sistema molt complex i la clau del seu èxit és l'àmplia, elaborada i dinàmica xarxa de comunicacions cel·lulars. Són moltes les cèl·lules que hi participen i que organitzades en conjunt, s'activen i segreguen substàncies per regular el seu propi creixement i comportament.

La base del correcte funcionament del sistema immunitari és la capacitat de poder distingir entre cèl·lules pròpies del cos i cèl·lules estranyes. Quan l'organisme detecta un agent estrany, denominat com **antigen**, es desencadena una resposta immunitària, tot i que teixits o cèl·lules provinents d'una altre persona també poden tenir el mateix efecte.

1.1.1 Estructura i cèl·lules del sistema immune

El sistema immune està format per **òrgans i teixits limfoides centrals** (medul·la òssia i timus) i **perifèrics** (ganglis limfàtics, melsa i teixit limfoide associat a mucoses) localitzats per tot l'organisme. Dins d'aquests trobem les cèl·lules encarregades de generar una resposta immune: limfòcits B i T, macròfags, cèl·lules NK (de l'anglès *Natural Killer*) i granulòcits. Aquestes provenen de cèl·lules mare hematopoètiques immadures de la medul·la òssia i responen a diferents citoquines i altres senyals químiques per madurar i donar la cèl·lula efectora final. Trobem:

- **Limfòcits B:** maduren al moll de l'os, constitueixen el 10-20% de la població de limfòcits circulants en sang perifèrica i la seva funció principal és la producció d'anticossos en resposta a antígens externs com bactèries, virus i cèl·lules tumorals, gràcies a la presència d'immunoglobulines a la superfície de la seva membrana. Cada cèl·lula B està programada per a la producció d'un anticòs específic.
- **Limfòcits T:** maduren al timus i només reconeixen determinants antigènics (o fragments dels antígens) situats a altres cèl·lules gràcies a la presència de receptors. Es divideixen en dos subgrups funcional i fenotípicament diferents; els anomenats **T helper CD4+** (Th), la funció dels quals és augmentar o potenciar la resposta immune mitjançant la secreció de factors especialitzats que provoquen l'activació

d'altres cèl·lules sanguínies, i el **limfòcits T *killer* CD8+** que s'encarreguen de l'eliminació directe de cèl·lules tumorals i/o cèl·lules infectades.

- **Cèl·lules NK:** són un altre tipus de cèl·lula letal, semblant als limfòcits T *killer* CD8+. Actuen com a cèl·lules efectores que eliminen directament determinats tumors i cèl·lules infectades. Es caracteritzen per a la presència de CD56 i l'absència de CD3.

- **Fagòcits i relatius:** els fagòcits són glòbuls blancs grans que digereixen patògens i altres partícules estranyes. Els monòcits són fagòcits que circulen per la sang, quan aquests migren als teixits es converteixen en macròfags. També trobem els **granulòcits** o leucòcits polimorfonuclears (PMN) que es componen principalment de tres tipus de cèl·lules conegudes com neutròfils, eosinòfils i basòfils, en funció de les seves característiques de tinció. Són predominantment importants en l'eliminació de bacteries i paràsits del cos, actuant com a primera línia de defensa. S'encarreguen de fagocitar els agents estranys i degradar-los mitjançant l'ús d'enzims potents.

1.1.2 La resposta immune

Les infeccions són la causa més comuna de malalties humanes. La pell proporciona una barrera important davant de microbis infectants, en general només és permeable a través de talls o petites lesions. Els tractes digestiu i respiratori també poden suposar una via d'entrada d'aquests però també contenen els seus propis mecanismes de protecció. Davant la infecció per un patogen, el **sistema immunitari innat** genera una primera resposta immediata i inespecífica on hi participen neutròfils, macròfags i cèl·lules NK activades de manera immediata. Si aquesta resposta no és prou eficient i el patogen persisteix, el **sistema immunitari adaptatiu** s'activarà com a segona línia de defensa. Aquesta és més específica contra l'antigen pels quals s'ha iniciat la resposta i està mediada principalment per limfòcits B i T. La principal característica d'aquest és que conserva una memòria per accelerar futures respostes, de manera que davant una segona infecció per al mateix patogen es generarà una resposta més ràpida i eficient (Figura 1).

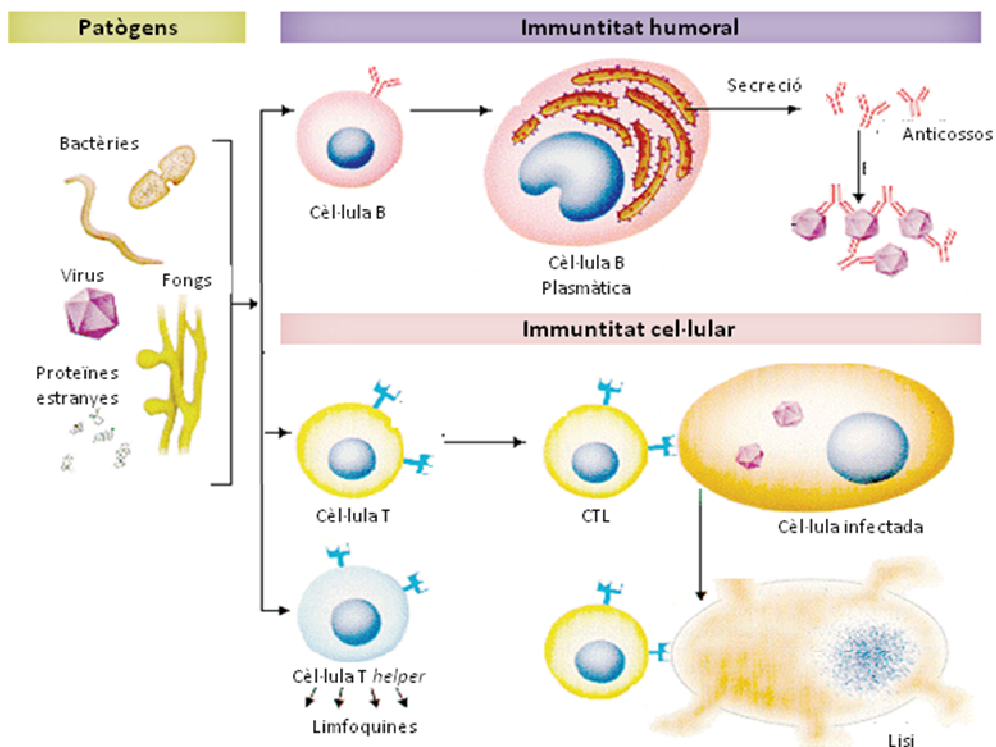


Figura 1. Agents patògens que poden desencadenar la resposta immune humoral l'objectiu de la qual és la producció d'anticossos per part de cèl·lules plasmàtiques o una resposta cel·lular, dirigida principalment a destruir cèl·lules infectades i així evitar la reproducció dels agents estranys. Aquesta està mediada bàsicament per limfòcits T.

1.1.3 Maduració i desenvolupament dels limfòcits B

La cèl·lula més inicial ja diferenciada del llinatge B de la medul·la òssia és el limfòcit pro-B que prové d'una cèl·lula mare limfoide (Hystad et al., 2007) (Figura 2). Aquests no disposen d'immunoglobulines (IG) a la membrana però comencen el procés de reordenament d'aquests gens gràcies a l'expressió de proteïnes RAG (de l'anglès *Recombination Activating Proteins*), encarregades del procés. Aquests limfòcits pro-B poden ser identificats mitjançant l'immunofenotip, ja que expressen CD34, HLA-DR, CD10, CD19, CD24 i l'enzim TdT (Hystad et al., 2007). Si el reordenament de les cadenes pesades dels gens de les immunoglobulines (IGHV) és productiu, el limfòcit es passa a denominar pre-B (Figura 2). Aquests tenen un pre-BcR i comencen a reordenar les cadenes lleugeres de les immunoglobulines, fins a la síntesi completa d'IgM, en aquest moment s'anomenen **limfòcits immadurs** (Hystad et al., 2007), i expressen CD20, CD21, CD22, CD24, CD40 i IgM de superfície, però perden l'expressió de TdT. Aquests, a través del seu receptor IgM poden reconèixer autoantígens a la medul·la òssia, però recentment s'ha demostrat en ratolins, que si aquest reconeixement és d'elevada afinitat, els limfòcits no generen suficients receptors de membrana per passar

al següent estadi maduratiu. Això genera la re-expressió de proteïnes RAG, promovent l'**edició del receptor** per intentar canviar la seva afinitat, i a més pateixen un procés de **desdiferenciació** (*back differentiation*) cap a estadis més primitius com pro-B i pre-B.

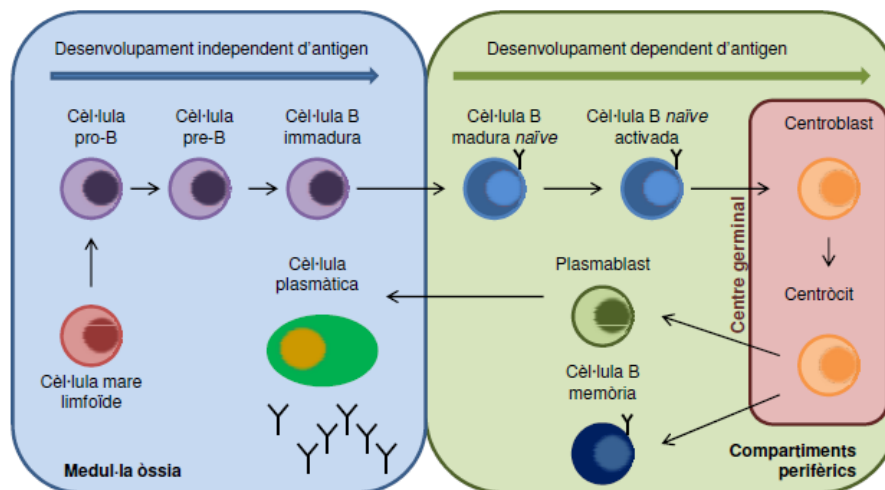


Figura 2. Diagrama esquemàtic dels estadis maduratius dels limfòcits B.

El següent estadi maduratiu és el de **limfòcit B madur**, en el què a més d'expressar IgM de superfície també s'expressa IgD, aquest és conegut com a **cèl·lula B naïve**. Aquestes sovint són positives per CD5 i són limfòcits petits en repòs que circulen a través de la sang (Inghirami et al., 1991). Els limfòcits B que surten de la medul·la i entren inicialment a la melsa s'anomenen **limfòcits B transicionals T1** (IgM^{alt} , IgD^{baix} , $CD21^{baix}$, $CD23^{-}$) i han de passar per un procés de selecció (Allman & Pillai, 2008; Dorshkind & Rawlings, 2005). Els limfòcits T1 que responen potentment contra autoantígens derivats del torrent sanguini són eliminats, mentre que els que sobreviuen es converteixen en limfòcits T2 (IgM^{alt} , IgD^{alt} , $CD21^{alt}$, $CD23^{+}$). Aquest són rescatats si són capaços de reconèixer antígens amb baixa afinitat, però moren per apoptosi si no reconeixen res. Com a resultat d'aquesta selecció, només entre l'1 i el 3% de limfòcits transicionals esplènics es converteixen en cèl·lules B naïve (Dorshkind & Rawlings, 2005).

Les cèl·lules B naïve, es divideixen en 2 grans grups:

- Limfòcits B marginals (IgM^{alt} , IgD^{baix} , $CD21^{alt}$, $CD23^{-}$)
- Limfòcits B fol·liculars (IgM^{alt} , IgD^{int} , $CD21^{int}$, $CD23^{+}$)

Ambdós poblacions recircularan i es localitzaran als ganglis limfàtics, la melsa i els teixits limfoides associats a mucosa (MALT) formant fol·licles (Dorshkind & Rawlings, 2005) (Figura 3). De manera general, aquests fol·licles es formen per respondre a antígens de manera depenent de limfòcits T, per la qual es requereix l'activació i la cooperació d'aquests (MacLennan, 1994). Quan una cèl·lula madura es troba amb l'antigen de manera específica i l'uneix amb l'afinitat adequada, es produeix un procés de **maduració de l'afinitat** que tindrà lloc al centre germinal (CG) dels ganglis limfàtics (Figura 3). D'aquest procés en resultaran cèl·lules B portadores de BcR amb un elevat grau d'afinitat per l'antigen (Liu et al., 1997; Manser, 2004).

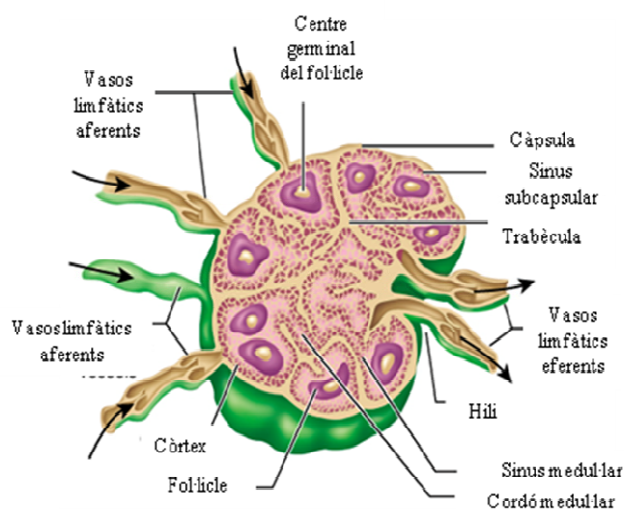


Figura 3. Estructura dels ganglis limfàtics. Aquests consten d'una càpsula externa (parènquima format per nòduls o fol·licles limfoides), una medul·la (part central per on circula el líquid limfàtic) i components vasculars (venes i artèries).

1.1.4 La reacció del centre germinal

Els ganglis limfàtics són òrgans limfoides perifèrics connectats a la circulació a través dels vasos limfàtics. Normalment no són palpables però esdevenen detectables davant una reacció immune intensa o la presència d'un tumor. Actuen com a filtres, de manera que s'encarreguen d'atrapar els antígens transportats per la limfa, així com del processament d'aquests. Els cúmuls de limfòcits B sota la càpsula, en el còrtex dels ganglis, reben el nom de **fol·licles limfoides** (o nòduls) dels quals la zona més perifèrica es denomina **zona marginal**, seguida de la **zona del mantell**, mentre que la porció central més clara és coneguda com a **centre germinal**. Els fol·licles que no presenten CG són fol·licles limfoides primaris (Liu et al., 1997; Manser, 2004) i estan constituïts principalment per cèl·lules B no estimulades per antígens. En resposta a aquesta estimulació antigènica, la cèl·lula B s'activa i es forma el CG esdevenint fol·licles

limfoides secundaris. La cèl·lula B activada que expressa CD10 i BCL6, es coneix com a **centroblast** i migrarà cap a l'interior del fol·licle a una zona més pròpia de cèl·lules T (Manser, 2004) Aquestes poden presentar l'antigen a les cèl·lules T CD4+ *helper*. Si aquesta cèl·lula reconeix el pèptid presentat per la cèl·lula B es sintetitza el lligand CD40 (CD40L). La unió CD40L a CD40 a la superfície de la cèl·lula B causa l'activació d'aquesta (Monson et al., 2001).

Els CG dels fol·licles limfoides secundaris consten d'una zona fosca pròxima a l'àrea paracortical rica en centroblast que es divideixen ràpidament, creant un aspecte dens i fosc (Guzman-Rojas et al., 2002), i una zona clara generalment polaritzada cap al lloc d'entrada dels antígens, rica en cèl·lules dendrítiques fol·liculars (CDF) i limfòcits T CD4+ *helper* (Figura 4).

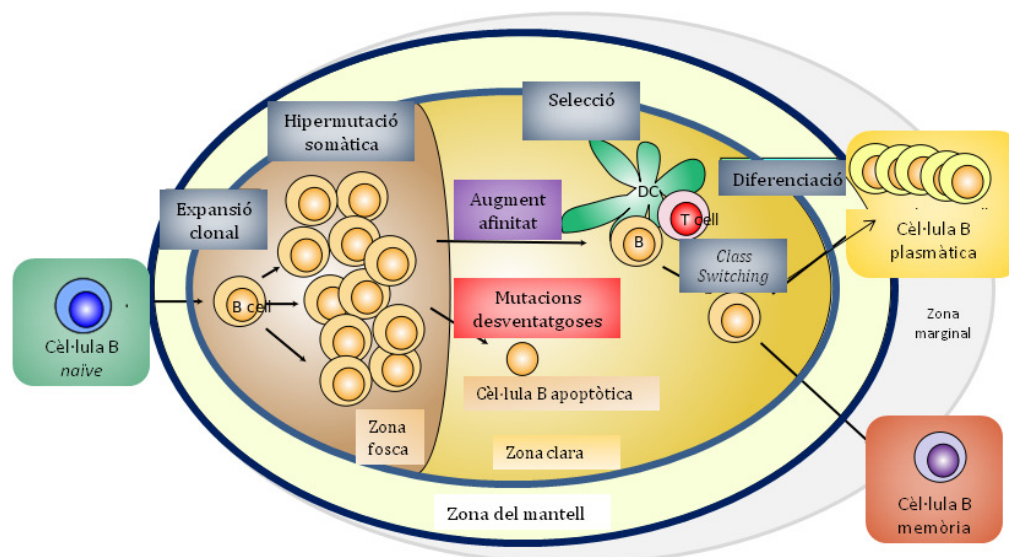


Figura 4. Reacció del centre germinal dels fol·licles limfoides secundaris.

En aquest punt, els centroblast no s'expressen IG de superfície i comencen el procés d'**hipermutació somàtica** (SHM) (Kleinsteïn et al., 2003). Un cop les cèl·lules entren a la zona clara, es tornen a expressar IG de superfície i les cèl·lules, ara anomenades **centròcits**, esdevenen més petites. Les cèl·lules B amb una afinitat d'unió per l'antigen estimulador inicial millorada, reben senyals de supervivència per part de les cèl·lules Th i proliferen en presència de l'antigen, fenomen denominat **selecció positiva**. Mentrestant, els centròcits que ja no s'uneixen a l'antigen, degut a que han patit una disminució de l'afinitat o bé reconeixen autoantígens, moren per apoptosi o són eliminats, aquest procés es coneix com a **selecció negativa** (Hartley et al., 1993). El centròcit es

diferenciarà cap a una **cèl·lula memòria** circulant (quedant en repòs, fase G₀ del cicle cel·lular, durant molts anys) o cap a una **cèl·lula plasmàtica** secretora d'IG, ambdós amb la finalitat de generar una resposta més ràpida i eficient (Manser, 2004) (Figura 4).

La melsa també conté una zona marginal en el límit de la polpa blanca on es localitzen limfòcits B, macròfags i cèl·lules dendrítiques, formant una regió especialitzada en resposta a antígens independents de cèl·lula T (Dorshkind & Rawlings, 2005). Els limfòcits d'aquesta zona marginal esplènica també poden reconèixer antígens i convertir-se en limfòcits B de memòria IgM⁺CD27⁺ (Tangye et al 2007;Weller et al., 2004).

Els CG han estat considerats els únics capaços de mantenir una elevada taxa de SHM (Manser, 2004). No obstant, s'ha demostrat que és possible que les cèl·lules B adquireixin mutacions fora de la reacció del CG i independentment de l'ajuda de les cèl·lules T (de Vinuesa et al., 2000;Monson et al., 2001;Weller et al., 2001). Com hem mencionat anteriorment, els teixits limfoides estan dividits en àrees fol·liculars i extrafol·liculars, les cèl·lules B de la zona marginal es poden trobar en zones extrafol·liculars, com ara, la zona marginal de la melsa, la capa subepitelial de les amígdals i el teixit MALT. Algunes cèl·lules B de la zona marginal també es poden trobar en petites quantitats als ganglis limfàtics, just a la zona del mantell (Pillai et al., 2005).

L'eficàcia del sistema immunitari depèn de la seva major o menor capacitat de reconèixer els antígens de manera específica. Tant les cèl·lules B com les T es troben implicades en aquest reconeixement, i encara que ho fan de manera diferent, ambdós poblacions poden interactuar amb un gran nombre d'antígens diferents. El número total de receptors (tan del limfòcit B com del T) s'anomena **repertori**.

1.2 IMMUNOGLOBULINES

1.2.1 Immunoglobulines de les cèl·lules B

A finals del segle XIX, Von Behring va observar que els sèrums d'animals que havien patit diftèria contenien substàncies que neutralitzaven l'efecte de la toxina diftèrica. A aquestes substàncies, que es caracteritzaven per ser termolàbils i no dialitzables, se les va denominar **anticossos**, degut a la seva capacitat de reconèixer toxines bacterianes. L'any 1937 se'ls va identificar com a les proteïnes del sèrum que migraven més lentament (Figura 5A) i se'ls va donar el nom de γ -globulines, quedant així associats com equivalents els conceptes d'anticòs i γ -globulines. Posteriorment, es va observar que no tots els anticossos migraven electroforèticament amb les γ -globulines i es van definir les α i β -globulines (Figura 5A). Com que no tots els anticossos són γ -globulines, Hebermans va proposar el terme **immunoglobulines** (IG) per designar a qualsevol substància amb capacitat d'anticòs.

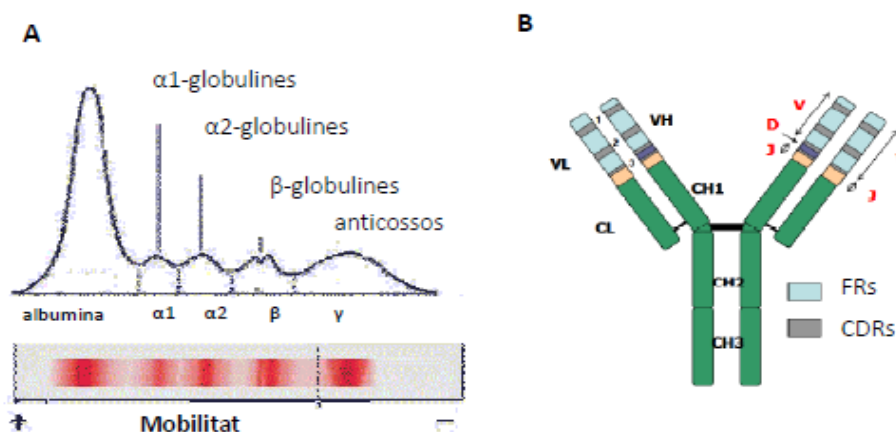


Figura 5. A) Electroforesi de les proteïnes del plasma sanguini. B) Diagrama esquemàtic de la unitat bàsica de les IG.

Les IG són glicoproteïnes formades per cadenes polipeptídiques que poden trobar-se de manera soluble a la sang i secrecions o bé associats a la membrana cel·lular dels limfòcits B. Les cèl·lules B porten múltiples còpies idèntiques d'immunoglobulines a la seva superfície cel·lular. Aquestes, juntament amb proteïnes accessòries, constitueixen els complexos coneguts com **BcR** (de l'anglès *B-Cell Receptor*), mitjançant els quals la cèl·lula reconeix i s'uneix a antígens externs (Rajewsky, 1996). Les cèl·lules B tenen un paper crucial en la resposta immune adaptativa, essent la presentació d'antígens i la producció d'anticossos les seves principals funcions. Anteriorment al contacte

antigènica, la cèl·lula B amb un BcR funcional es coneix com a cèl·lula B *naïve*. L'especificitat de cada IG és única per cada cèl·lula B, quan l'antigen s'uneix adequadament al BcR es produeix un procés de maduració de l'afinitat que té lloc a estructures especialitzades dels òrgans limfoides secundaris. Aquestes cèl·lules B madures es poden diferenciar cap a cèl·lules plasmàtiques productores d'anticossos o bé cap a cèl·lules de memòria (MacLennan, 1994). Però a part d'això, aquesta no és la única funció del BcR, lluny de ser una molècula inherent actua també com a senyal activa i dinàmica de transmissió. És a través del les IG que la cèl·lula rep senyals externes que la poden induir a proliferar, ser anèrgica, editar el seu BcR o, en determinades circumstàncies, entrar en apoptosi. De manera que el resultat de l'estimulació antigènica depèn de múltiples factors, tals com les cèl·lules presents al microambient, la interacció amb co-receptors i el tipus i la concentració d'antigen (Stevenson & Caligaris-Cappio, 2004).

1.2.2 Estructura dels gens de les immunoglobulines

Des del punt de vista estructural, cada molècula d'immunoglobulina està formada d'una unitat bàsica que consisteix en 4 cadenes polipeptídiques; dues cadenes pesades idèntiques (cadenes H, de l'anglès *heavy chain*) de 450-550 aminoàcids cadascuna, i dues cadenes lleugeres idèntiques (cadenes L, de l'anglès *light chain*) de 220 aminoàcids. Aquestes 4 cadenes estan unides entre si mitjançant enllaços disulfur entre residus de cisteïnes. Cada cadena L està lligada per aquests enllaços a una cadena H i cada cadena H està lligada a una cadena L i també a l'altra H (Figura 5B).

Cadena pesada H: en mamífers hi ha 5 tipus de cadenes pesades: α , δ , ϵ , γ i μ que es troben respectivament als anticossos IgA, IgD, IgE, IgG i IgM. Aquestes defineixen la classe d'immunoglobulina i tenen diferent dimensió i composició.

Cadena lleugera L: en mamífers hi ha 2 tipus de cadenes lleugeres, κ i λ . Cada cadena lleugera conté dos dominis successius, un constant i un variable.

Cada cadena, tant H com L, està formada per diferents dominis estructurals que contenen entre 10 i 110 aminoàcids, i que es classifiquen en diferents categories depenent de la seva mida i la seva funció. Podem trobar el domini o regió variable (V) que és la part de la molècula que interacciona amb l'antigen, mentre que la regió constant (C) determina l'isotip de la molècula i, com a conseqüència, confereix la

funció efectora. Cada domini V està format per altres regions altament conservades conegudes com *framework regions* (FRs) intercalades amb unes altres regions hipervariables denominades *complementarity determining regions* (CDRs) (Lefranc et al., 1999) (Figura 6). Les FRs s'encarreguen del manteniment de la integritat estructural de la molècula, mentre que les CDRs són les responsables de generar la gran diversitat del lloc d'unió de l'antigen, en particular, la regió VH CDR3 que és la més variable i la que presenta més contacte físic amb l'antigen.

Per altra banda, la regió V de cada cadena pesada està codificada per diferents parts, que es coneixen com a segments. Aquests són coneguts com segment variable (V), diversitat (D) i d'acoblament (J, de l'anglès *joining*) (Figura 6). A les cadenes lleugeres només s'hi troben segments V i J. Hi ha múltiples còpies de tots aquests segments organitzats en tàndem en el genoma dels mamífers (Nemazee, 2006).

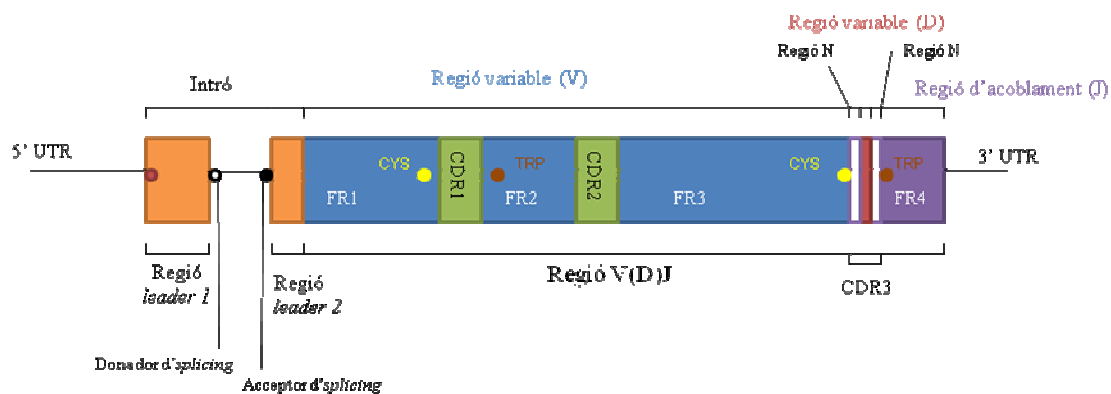


Figura 6. Organització molecular de la seqüència dels gens de les IG en el DNA genòmic. Les mutacions somàtiques poden tenir lloc tan a FRs com a CDRs. Durant al recombinació, l'enzim dideoxinucleotidil transferasa (TdT) addiciona nucleòtids de manera aleatòria creant les regions N. Els residus de cisteïna (CYS) i triptòfan (TRP) es troben conservats i marquen les posicions d'anclatge.

1.2.3 Organització del locus de les immunoglobulines

El locus de la cadena pesada es troba codificat al cromosoma 14, específicament a 14q32.33, molt a prop de la regió telomèrica (Croce et al., 1979;Kirsch et al., 1982;McBride et al., 1982). Dins d'aquest hi ha 123-129 gens IGHV (depenent de l'haplotip analitzat), dels quals només entre 38 i 46 són funcionals (Croce et al., 1979;Kirsch et al., 1982;Lefranc et al., 2005;McBride et al., 1982;Stavnezer, 1996). Hi ha 23 IGHD i 6 IGHI gens funcionals *downstream* dels gens IGHV. Dins d'aquesta regió també es troben codificats 9 gens constants, IGHC (Figura 7A). Els gens funcionals són els que presenten una pauta oberta de lectura (de l'anglès *Open Reading Frame*, ORF) sense cap codó stop, però a part d'aquests, el locus IG també conté nombrosos pseudògens, que no són funcionals degut a la presència de mutacions puntuals perjudicials o bé codons stop prematurs.

Els gens IGHV estan dividits en 7 subgrups de diferent homologia amb almenys el 80% d'identitat entre els membres d'un mateix grup. El subgrup IGHV3 és el més gran, format aproximadament per 21 gens funcionals, seguit per l'IGHV4 i l'IGHV1 amb 10 i 9 gens funcionals, respectivament. La resta de subgrups d'IGHV (IGHV2, IGHV5, IGHV6, IGHV7) són molt menys freqüents a l'hora de reordenar i impliquen només 6 gens funcionals en total (Lefranc et al., 1999;Lefranc et al., 2009). Basant-se en la similitud de la seqüència de nucleòtids els subgrups IGHV estan, a la vegada, assignats en categories més amples, conegudes com a **clans**. El clan I es compon d'IGHV1, IGHV5 i IGHV7, el clan II d'IGHV2, IGHV4 i IGHV6, mentre que el clan III només consta d'IGHV3.

La cadena lleugera pot tenir 2 isotips: kappa (κ) o lambda (λ), encara que en general només un serà expressat per cada cèl·lula. Els gens IGL κ estan localitzats al braç curt del cromosoma 2 (2p11.2), mentre que els gens IGL λ es localitzen al cromosoma 22 (22q11.2) (Figura 7B i C). El locus IGL κ consta de 31-35 gens IG kappa variables (IG κ V), 5 IG kappa *joining* (IG κ J) i 1 IG kappa constant (IG κ C). L'organització genòmica d'aquest és singular, tots els gens s'organitzen en 2 *cassettes*. El *cassette* proximal, situat immediatament *upstream* del clúster IG κ J, i els *cassette* distal separat del proximal per 800Kb i per tant, més allunyat de IG κ J (Figura 7B). En realitat, el *cassette* distal és una duplicació del proximal però amb orientació invertida. En conseqüència, els gens IG κ V del grup distal són quasi la imatge especular del seu gen homòleg situat *downstream* i que es denominen amb la lletra D. En alguns casos els

gens dels diferents *cassettes* no es poden distingir en termes de seqüència de nucleòtids i es descriuen com una parella de gens, per exemple IGKV1-12/IGKV1D-12.

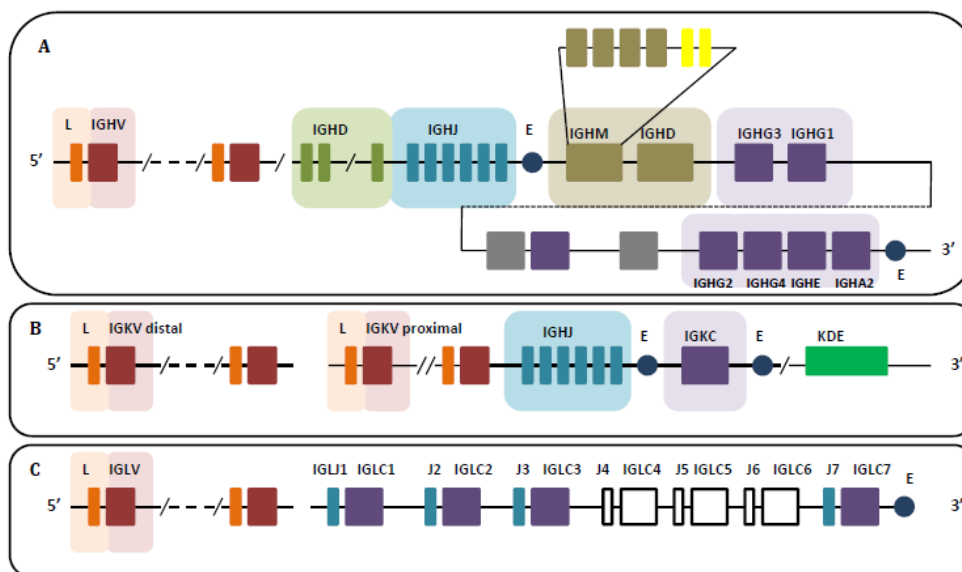


Figura 7. Organització dels gens de les immunoglobulines en humans abans del reordenament, per a cada cadena corresponent: IGHV (A), IGL κ (B) i IGL λ (C).

1.2.4 Funció i reordenament de les immunoglobulines. Mecanismes de generació de diversitat

Els limfòcits B s'originen i maduren a la medul·la òssia, però una vegada completats tots els canvis s'ubiquen als ganglis limfàtics, on s'activen en presència d'un agent estrany. Durant el procés de maduració expressen diferents molècules de superfície útils per la seva identificació i coneixement de la seva capacitat funcional (Figura 8). La funció essencial és la d'unir-se a antígens, actuant com a receptors de senyals antigèniques (en el cas d'immunoglobulines de membrana) o bé col·laborant en la destrucció antigènica (quan interaccionen amb macròfags, neutròfils i cèl·lules NK).

S'estima que el repertori necessari d'anticossos pot ascendir a 10^9 molècules diferents. Aquesta gran diversitat en el repertori s'aconsegueix gràcies a un procés anomenat **recombinació somàtica** que assegura el poder respondre de manera específica. És un procés pel qual diferents segments de DNA es barregen a l'atzar per formar un únic gen, d'aquesta manera s'explica com uns pocs segments, en combinar-se, poden generar aquesta gran quantitat d'immunoglobulines funcionals.







	Cèl·lula mare limfoide	Pro-B primària	Pro-B tardana	Pre-B	Linfòcit B immadur	Linfòcit B madur
						
Gens IgH	germinal	reordenament D-J	reordenament V-DJ	VDJ reordenat	VDJ reordenat	VDJ reordenat
Gens IgL	germinal	germinal	germinal	reordenament V-J	VJ reordenat	VJ reordenat
Ig superfície	absent	absent	absent	Cadena μ (pre-BCR)	IgM	IgM + IgD
Altres molècules	CD34	CD10	CD10	CD19	CD19	CD19
	CD19	CD19	CD19	CD38	CD21	CD21
	CD38	CD38	CD38	CD40	CD40	CD40
	HLA-II	CD40	CD40	CD24	CD24	CD24
	TdT	CD24	CD24	CD45R	CD45R	CD45R
		CD45R	CD45R	CD43	CD20	CD20
		CD43	CD43	CD20	HLA-II	HLA-II
		HLA-II	HLA-II	HLA-II		
		TdT	TdT	TdT		

Figura 8. Estat del reordenament de les IG segons l'etapa de maduració dels limfòcits B. Marcadors expressats a cada etapa corresponent.

1.2.4.1 Recombinació V(D)J

Les cèl·lules progenitores B (cèl·lules pro-B) es diferencien de les cèl·lules mare limfoïdes en resposta a l'estimulació de les cèl·lules veïnes de la medul·la òssia. Aquestes cèl·lules pro-B expressen CD43, CD19 i CD24, i en aquest punt comença el reordenament de la immunoglobulina. El procés comença amb la recombinació D-J, que implica la unió d'un gen del segment D amb un altre del segment J del locus de la cadena pesada (Figura 9). El fragment de DNA que queda entre els segments de DNA seleccionats és eliminat. Posteriorment es produeix la unió del complex D-J amb el gen V, donant lloc a un gen V(D)J reorganitzat.

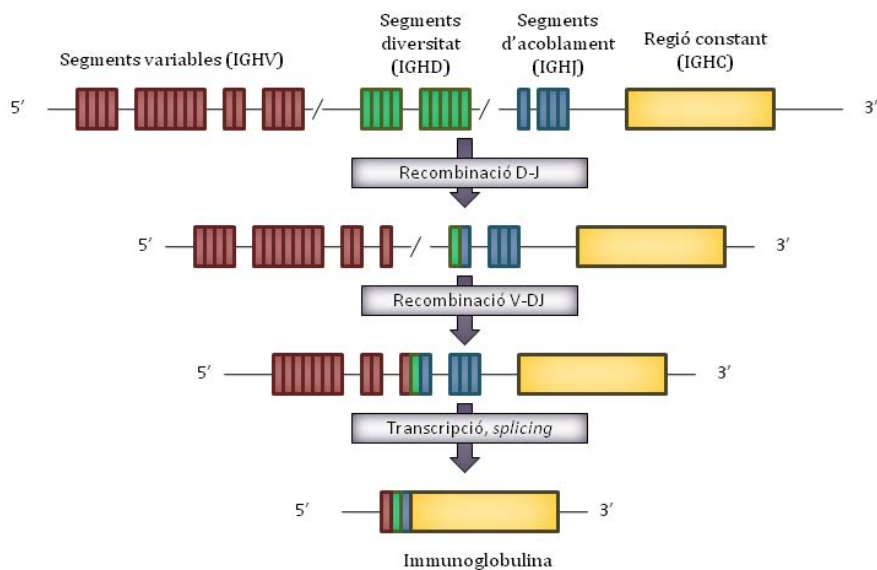


Figura 9. Procés de recombinació dels gens de les IG fins a donar-ne una completament funcional.

Es genera un transcrit primari que conté la regió V(D)J de la cadena pesada, a més a més dels gens que codifiquen per la regió constant. L'RNA primari es processa afegint una cua de poliadenilació (poli-A) després de la cadena constant seleccionada.

El reordenament de les cadenes lleugeres és molt similar, però com que aquestes no tenen segments D, el primer pas del procés és la unió directa d'un segment J amb un V i la posterior addició d'una cadena constant. L'acoblament de les dues cadenes pesades amb les dues cadenes lleugeres donarà lloc a la producció de la immunoglobulina que s'expressarà a la membrana dels limfòcits B.

1.2.4.2 Hipermutació somàtica (SHM)

El procés d'hipermutació somàtica es considera el segon cicle de diversificació després del procés de recombinació V(D)J, amb el qual s'aconsegueix un increment de la diversitat d'anticossos i una producció d'aquests amb elevada especificitat (Liu et al., 1997). Les mutacions introduïdes són principalment substitucions i, ocasionalment, es troben insercions i delecions en una regió d'1-2 kb al voltant de la regió codificant. A les cèl·lules B normals, les mutacions que produeixen substitucions aminoacídiques clusteritzen més freqüentment a les CDRs que no pas a les FRs, ja que aquestes estan enriquides amb motius *hotspot* reconeguts per l'enzim citidina deaminasa (AID) (Milstein et al., 1998; Rogozin & Diaz, 2004; Rogozin et al., 1996). L'AID pertany a la família d'enzims "editors de l'RNA" i actua desaminant els residus de citosina del

DNA en uracil provocant un *missmatch* U-G. Els uracils normalment no estan presents al DNA, de manera que quan el DNA es replica, l'U és reconegut com a T, provocant que s'introdueix una mutació. Alternativament, les mutacions també poden crear-se per acció de l'enzim de reparació uracil-DNA glicosilasa (que elimina directament l'U i el substitueix per qualsevol de les 4 bases del DNA), pel sistema de reparació per excisió, o bé pel sistema de reparació de *missmatch*.

1.2.4.3 Commutació de l'isotip (CSR)

És el procés biològic que fa canviar l'anticòs d'una classe a una altra, passant d'IgM i IgD (present en limfòcits verges) a IgG, IgA o IgE. Durant aquest procés es canvia la porció de la regió constant de la cadena pesada de l'anticòs (IGHC) però no afecta a la regió variable, per tant, no afecta a l'especificitat, de manera que se seguirà unint als mateixos antígens. L'isotip de l'anticòs determinarà la manera com els antígens seran capturats i eliminats.

1.2.5 Repertori de les IG de les cèl·lules B normals i neoplàsies limfoides

El número de possibles reordenaments IGHV-D-J és enorme, però sembla ser que la sobre-representació de determinats gens en el repertori de les cèl·lules B normals, és un fenomen natural. Segons Brezinschek *et al.* IGHV3, IGHV1 i IGHV4 són les famílies predominants, mentre que a nivell individual ho són IGHV3-23, IGHV3-30 i IGHV4-59 entre d'altres, en funció de la població estudiada (Wu *et al.*, 2010; Brezinschek *et al.*, 1997). També s'ha observat l'ús preferencial d'alguns gens en l'anàlisi de les cadenes lleugeres (Agathangelidis *et al.*, 2011; Foster *et al.*, 1997).

El procés de recombinació V(D)J es produeix abans de l'exposició a l'antigen i així es crea el repertori pre-immune. L'exposició a autoantígens o antígens exògens condueix a processos tals com la SHM i l'edició del receptor per crear més diversitat. Per tant, el biaix descrit anteriorment no només és degut a la interacció amb determinats antígens, sinó també pel biaix inherent del repertori pre-immune degut a factors genètics i epigenètics com la recombinació eficient degut a la composició de les RSS (seqüències senyalitzadores de la recombinació que participen en el procés de SHM), l'eficiència de l'enzim d'escissió RAG (gen activador de la recombinació), la localització del gen, i la orientació transcricional (en el cas de la cadena lleugera) que podria afectar a la freqüència de reordenament de determinants gens (Foster *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 2002).

Aquesta pressió selectiva en la conformació del repertori del gens de les IG en poblacions de cèl·lules normals per un conjunt limitat d'antígens i/o superantígens, també s'ha observat en altres processos limfoproliferatius com la leucèmia limfàtica crònica de cèl·lules B (LLC) i el limfoma de la zona marginal esplènica (LZME), hipotetitzant que aquests fenòmens d'estimulació antigènica podrien estar involucrats en la patogènesi d'aquestes neoplàsies. De manera que l'evidència immunogenètica en el desenvolupament de limfomes és clara, el que encara queda per establir és si això implica la selecció de cèl·lules progenitores diferents o bé si aquestes responen de manera preferencial a determinats estímuls.

1.3 NEOPLÀSIES LIMFOIDES

Les neoplàsies limfoides són tumors clonals que afecten a formes madures i immadures de cèl·lules B, T i NK en diferents estadis de la diferenciació. La biologia i les manifestacions clíniques d'aquestes són molt diverses, degut principalment a l'existència d'una gran complexitat cel·lular i funcional de les poblacions d'origen, així com a l'heterogeneïtat dels mecanismes patogènics que contribueixen al seu desenvolupament i progressió (Evans & Hancock, 2003; Jaffe et al., 2008).

Les causes biològiques de l'aparició d'aquestes neoplàsies són diverses però, com en la majoria dels càncers, s'originen a partir d'una sola cèl·lula que va acumulant mutacions al llarg dels anys. Aquestes alteracions poden afectar a **proto-oncogens** (convertint-los en oncògens i contribuint així en la malignització del llinatge cel·lular), gens supressors de tumors (que deixen d'expressar-se o produeixen una proteïna no funcional) i gens de reparació del DNA (conduint a l'aparició de múltiples mutacions amb efectes cancerígens).

1.3.1 Classificació

Degut a la pròpia diversitat ha estat difícil establir criteris definitius de classificació de les neoplàsies limfoides. La correcta classificació és important per ajudar a establir el pronòstic i decidir el tractament més adequat per cada cas. Durant la dècada dels anys 70, es van proposar diferents models per a la classificació i a l'any 1982, en un intent d'unificar criteris, es va publicar un ambiciós treball realitzat per d'Institut Nacional del Càncer (NCI) dels Estats Units que comparava 6 de les classificacions més importants ja existents, donant com a resultat el que es coneix com la *Working Formulation for Clinical Usage*, que va ser molt utilitzada tan per patòlegs com per clínics (NCI, 1982). Tot i l'esforç, encara tenia certes limitacions, donat que només estava basada en criteris morfològics i mètrics cel·lulars. Conseqüentment, l'any 1994, un grup internacional de patòlegs (*International Lymphoma Study Group*, ILSG) va consensuar una proposta denominada classificació REAL (*Revised European-American Lymphoma Classification*) per actualitzar la classificació existent.

Neoplàsies de cèl·lules B

Precursors de cèl·lula B

- Leucèmia/limfoma limfoblàstic de precursors B

Neoplàsies de cèl·lules B perifèriques

- Leucèmia limfàtica crònica/limfoma limfocític de cèl·lules petites
- Limfoma de cèl·lules del mantell
- Limfoma fol·licular
- Limfoma de la zona marginal esplènica
- Tricoleucèmia
- Limfoma limfoplasmacític
- Plasmocitoma/Mieloma múltiple
- Limfoma difús de cèl·lules grans
- Limfoma difús de cèl·lules grans associat a inflamació crònica
- Leucèmia prolimfocítica
- Limfoma de Burkitt
- Limfoma B de la zona marginal extraganglionar (MALT)
- Limfoma B de la zona marginal ganglionar
- Limfoma de cèl·lules B amb característiques intermèdies entre el limfoma difús de cèl·lules grans i el limfoma de Burkitt
- Limfoma de cèl·lules B amb característiques intermèdies entre el limfoma difús de cèl·lules grans i el limfoma de Hodgkin

Neoplàsies de cèl·lules T i NK

Precursors de cèl·lules T

- Leucèmia/limfoma limfoblàstic T

Neoplàsies de cèl·lules T perifèriques (madures) i NK

- Leucèmia prolimfocítica T
- Leucèmia de limfòcits granulars
- Leucèmia de cèl·lules NK agressiva
- Leucèmia/limfoma T adult
- Limfoma extraganglionar NK/T
- Limfoma entereopàtic
- Limfoma hepatoesplènic
- Panniculitis subcutània
- Micosis fungoide
- Limfoma anaplàstic
- Limfoma T perifèric
- Limfoma angioimmunoblàstic
- Limfoma anaplàstic tipus sistèmic

Limfomes de Hodgkin**Taula 1.** Classificació actual de les neoplàsies limfoides presentada per la OMS (2008).

Posteriorment, aquesta classificació va ser també modificada i actualment s'utilitzen els criteris de classificació descrits per la Organització Mundial de la Salut (OMS) (Swerdlow et al., 2008), que inclou tres categories principals de neoplàsies limfoides: les provinents de cèl·lula B (77%), les de cèl·lula T/*Natural Killer* (6%) i el limfoma de Hodgkin (9%), mentre que el 8% restant segueix quedant inclassificat o entre diverses formes de limfomes, en el que es coneix com a zona gris. Les neoplàsies B tendeixen a mimetitzar els estadis de diferenciació de les cèl·lules B normals, aquesta similitud és la base per a seva agrupació i nomenclatura, de manera que la última classificació de la OMS, està basada principalment en el llinatge cel·lular i una combinació de característiques clíniques, morfològiques, immunofenotípiques i genètiques (Taula 1).

La morfologia i l'immunofenotip semblen ser característiques suficients per al diagnòstic de la majoria de neoplàsies limfoides, però no existeix cap marcador únic que sigui específic d'una única neoplàsia. De manera que la combinació de les característiques morfològiques i un panell de marcadors antigènics són necessaris per al correcte diagnòstic. Tot i això, dins d'una mateixa entitat concreta, es troben variacions de les característiques immunofenotípiques, de manera que els estudis moleculars (tan genètics com d'expressió gènica) poden resultar molt útils per afinar en el diagnòstic i la correcte classificació de les neoplàsies limfoides.

Degut a que les neoplàsies limfoides inclouen entitats molt diferents des del punt de vista histològic, clínic i evolutiu, els pacients requereixen tractaments que depenen en gran mesura de l'agressivitat del limfoma i que s'han d'ajustar-se al risc que presenta cada malalt.

1.4 LIMFOMA DE CÈL·LULES DEL MANTELL

Aquesta tesi es centra bàsicament en l'estudi del limfoma de cèl·lules del mantell (LCM), una neoplàsia limfoide de cèl·lules B madures, denominat així donat que s'hipotetitza que la cèl·lula d'aquest tumor és un limfòcit B el microambient físic del qual correspon a la zona del mantell dels fol·licles limfoides secundaris.

El LCM és una neoplàsia de cèl·lules B que representa aproximadament el 3-10% (Sant et al., 2010) dels limfomes no-Hodgkin, amb una incidència anual estimada de 0.45/100.000 casos/any. Aquesta incidència ha augmentat en els últims anys, tot i que es creu que això podria estar relacionat amb els canvis en les tècniques de diagnòstic (Morton et al., 2006). Es dona principalment en individus d'edat avançada, al voltant dels 60 anys i afecta preferencialment a homes (2.5-3:1). Normalment es troba afectació a ganglis limfàtics, tot i que la melsa i la medul·la òssia, també són llocs importants. A més, la majoria dels casos presenta, també, afectació a sang perifèrica. Les cèl·lules neoplàsiques generalment tenen un mida petita-mitjana, amb un contorn nuclear irregular i presenten un elevat **índex proliferatiu**, esdevenint el LCM una malaltia molt agressiva i difícilment curable.

1.4.1 Morfologia i immunofenotip

El LCM clàssic està caracteritzat per una proliferació limfoide monomòrfica, vagament nodular i difusa a la zona del mantell. Tot i això aquestes cèl·lules tumorals tenen tendència a disseminar-se pel cos, de manera que pocs casos mostren afectació quasi exclusivament restringida a la zona del mantell, en aquests casos es parla de **LCM “*in situ*”** (Richard et al., 2007). Les cèl·lules tumorals tenen aspecte de centròcits, amb cromatina dispersa i un discret nuclèol. Existeixen diferents variants morfològiques, importants per la seva significació clínica: a) blàstic: format per cèl·lules de mida mitjana i de nucli arrodonit, i amb un índex mitòtic molt elevat que li confereix molta agressivitat, b) pleomòrfic: format per cèl·lules de mida gran i nuclis irregulars amb cromatina dispersa, presenta un elevat índex mitòtic, c) de cèl·lula petita i d) de tipus zona marginal (Figura 10).

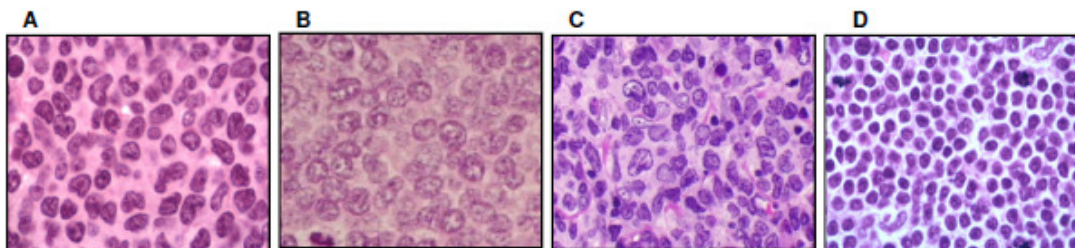


Figura 10. Variants morfològiques. El LCM clàssic (A) es caracteritza per una proliferació monòtona de limfòcits petits i mitjans amb citoplasma escàs, nucli irregular i cromatina condensada. Les variants blàstiques (B) i pleomòrfiques (C) presenten elevada agressivitat degut a l'elevat índex mitòtic. La variant de cèl·lula petita (D) presenta cèl·lules de mida petita amb nuclis arrodonits imitant a la leucèmia limfàtica crònica (LLC).

Les cèl·lules de LCM expressen IgM/IgD en superfície i reordenen principalment la cadena lleugera lambda (IGL λ). També tenen expressió dels marcadors de membrana: CD5, CD19, CD20, CD22, CD43 i CD79. No expressen CD10 ni BCL6 i no solen ser positius per CD23. S'han descrit fenotips aberrants, com l'absència de CD5 i l'expressió de CD10 i BCL6, normalment associats a variants blàstiques i/o pleomòrfiques. Tots els casos són positius per l'expressió de la proteïna BCL2 i gairebé tots presenten positivitat immunohistoquímica per la ciclina D1 (Figura 11A), inclús els casos CD5 negatius.

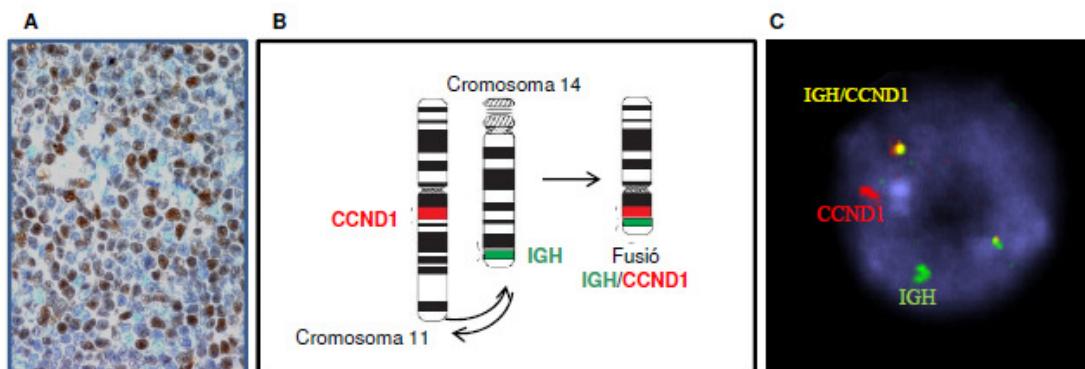


Figura 11. Sobrexpressió del gen de la CCND1 detectada per immunohistoquímica (A) com a conseqüència de la presència de la translocació t(11;14)(q13;32). Esquema (B) i imatge obtinguda per FISH (C) de la translocació recíproca entre els cromosomes 11 i 14.

1.4.2 Període de latència

El LCM es caracteritza per la translocació $t(11;14)(q13;q32)$, present pràcticament en tots els casos i considerat el primer esdeveniment oncogènic que es dona en medul·la òssia en un estat pre-B de la diferenciació. Recentment s'ha demostrat que aquesta neoplàsia pot tenir un llarg període de latència i probablement no totes les cèl·lules que adquireixen la translocació inicial es transformen en un limfoma maligne. S'han descrit baixos nivells de la $t(11;14)$ en sang perifèrica d'individus sans. Aquests clons poden persistir durant un llarg període de temps, entre 7 i 9 anys (Lecluse et al., 2009). L'existència d'aquests llargs períodes de latència s'ha posat en evidència en un estudi en el que un donant i el seu receptor desenvolupen simultàniament un LCM amb el mateix origen clonal, després d'un transplantament halogènic de medul·la òssia realitzat 12 anys abans (Christian et al., 2010). Un estudi retrospectiu en 7 pacients de LCM va identificar un LCM "*in situ*" en biòpsies prèvies obtingudes entre 2.1 i 15.5 anys abans del desenvolupament del LCM clínic, confirmant la idea de la presència d'un llarg període de latència des de l'inici fins al desenvolupament de la malaltia clínicament simptomàtica (Racke et al., 2010).

1.4.3 Genètica

La translocació $t(11;14)(q13;q32)$ (Figura 11B i C) és el primer esdeveniment genètic i juga un paper clau en la creació d'instabilitat genòmica que condueix a l'evolució del tumor. Aquesta translocació juxtaposa el gen de la cadena pesada de les immunoglobulines (IGHV) amb el gen de la ciclina D1 (*CCND1*), provocant una sobreexpressió d'aquesta a nivell de RNA missatger (mRNA) i proteïna, i com a conseqüència influent en cicle cel·lular i en la progressió del tumor.

Per altra banda, més del 90% dels LCM presenta altres alteracions cromosòmiques secundàries no aleatòries, que semblen ser necessàries per a la progressió de la malaltia. Aquestes inclouen guanys en 3q, 7p i 8q, així com pèrdues en 1p, 6q, 9p, 11q, 13q, i 17p i en alguns casos trisomia 12 i tetraploïdies (principalment en les variants pleomòrfiques) (Royo et al., 2011). Algunes d'aquestes alteracions citogèniques poden estar associades amb determinats paràmetres clínics com la presentació leucèmica (Ferrer et al., 2007; Parry-Jones et al., 2007).

Les dianes de les alteracions oncogèniques estan implicades en vies de resposta al dany al DNA i cicle cel·lular (*CDKN2A*, *CDKN2B* i *MTAP*), mutacions inactivants en el gen d'*ATM* (11q22-23) detectades en el 40-75% dels casos, encara que de manera ocasional, aquestes mutacions també han estat detectades en línia germinal. Les variants altament proliferants presenten freqüentment mutacions a *TP53*, delecions homozigotes de *CDKN2A* (*INK4a/ARF*), amplificacions i sobreexpressió de *BMI1* i *CDK4* (Bea et al., 1999; Bea et al., 2009), així com microdeleccions ocasionals d'*RB* (Pinyol et al., 2007) (Taula 2).

Per altra banda, l'anàlisi de tumors primaris amb plataformes d'elevada resolució com array-CGH (Kohlhammer et al., 2004; Salaverria et al., 2008) i SNP-array (Rinaldi et al., 2006; Thelander et al., 2006) combinat amb dades d'expressió gènica ha revelat noves regions alterades, com delecions homozigotes a 1p33 (*FAF1*, *CDKN2C*), 2q13 (*BCL2L11*), 2q37 (*SP100*) i 19q13.1 (superfamília de gens *TNF*), relacionades amb el pronòstic dels pacients (Bea et al., 2009; Hartmann et al., 2010; Kawamata et al., 2009) (Taula 2).

Alteració	Gens diana	Vies
del 1p32.3	<i>FAF1/CDKN2C</i>	Supervivència i cicle cel·lular
del 2q34	<i>MAP2</i>	Microtúbuls
del homo 2q13	<i>BCL2L11</i>	Supervivència cel·lular
del 6q24/25	<i>LATS1</i>	Hippo: proliferació i supervivència
del 6p23	<i>TNFAIP3/A20</i>	Inhibició NF-kB
del 8p23	<i>MCPH1</i>	Resposta dany al DNA
del 9p21.3	<i>CDKN2A/MTAP</i>	Cicle cel·lular
del bial·lèlica 9p21	<i>CDKN2B</i>	Cicle cel·lular
del 9p	<i>MOBLK2B</i>	Hippo: proliferació i supervivència
amp 10p12.2	<i>BMI1</i>	Cicle cel·lular
del 11q22-23	<i>ATM</i>	Augment inestabilitat genètica
amp 11q13.4-q13.5	<i>MAP6</i>	Microtúbuls
amp 12q13	<i>CDK4/MDM2</i>	Cicle cel·lular i apoptosi
del 13q14.2	<i>RB1</i>	Cicle cel·lular
del 13q33-34	<i>CUL4A/ING1</i>	Cicle cel·lular i resposta al dany al DNA
amp 18q21	<i>BCL2</i>	Supervivència cel·lular i apoptosi
del 19p	<i>MOBLK2B</i>	Hippo: proliferació i supervivència

Taula 2. Potencials gens diana de les alteracions genètiques recurrents en LCM (Abreviatures: amp: amplificació; del: deleció).

1.4.4 Vies patogenètiques implicades

· **Degudes a alteracions genètiques:** són alteracions que afecten principalment a elements de control del cicle cel·lular, vies de resposta/reparació al dany al DNA i a la supervivència cel·lular (Jares & Campo, 2008; Jares et al., 2007) (Taula 2). El refinament dels estudis genètics no només permet ampliar el coneixement de gens implicats en aquests mecanismes sinó que demostra la implicació de noves vies com l'Hippo, relacionada amb la proliferació i l'apoptosi (Hartmann et al., 2010) i alteracions genètiques de la xarxa de proteïnes associades als microtúbuls (Vater et al., 2009) (Taula 2).

· **Activades en LCM sense alteracions genètiques aparents:** són alteracions que impliquen principalment vies de creixement cel·lular i supervivència.

· **Via PI3K/AKT/mTOR:** és la via que connecta els senyals extracel·lulars (incloent el BcR en limfòcits) amb mecanismes com la proliferació, el creixement i la supervivència. Estudis dels perfils d'expressió van identificar una sobre-regulació de molts dels gens implicats en aquesta via de senyalització (Rizzatti et al., 2005). A més, les cèl·lules tumorals presenten elevats nivells de les formes actives fosforilades d'elements claus com AKT i mTOR (Peponi et al., 2006; Rudelius et al., 2006). No es coneix la causa de l'activació constitutiva d'aquesta via, però cal destacar-ne la seva importància degut als efectes *in vitro* sobre el cicle cel·lular i la supervivència d'inhibidors de PI3K i mTOR, així com les respostes clíniques obtingudes en pacients de LCM amb recaigudes i prèviament tractats amb aquests inhibidors (Hess et al., 2009; Jares et al., 2007; Perez-Galan et al., 2010).

· **Via canònica de WNT:** la desregulació d'aquesta via juga un paper important en la patogènesis d'una àmplia varietat de tumors humans. Estudis moleculars i funcionals suggereixen que aquesta via està activada en LCM (Rizzatti et al., 2005) degut a la presència de GSK3B fosforilat i inactiu que provoca l'acumulació nuclear de β -catenina (Gelebart et al., 2008; Hess et al., 2009; Peponi et al., 2006; Perez-Galan et al., 2010).

· **Via NF- κ B:** activada constitutivament en línies cel·lulars i tumors primaris de LCM per sobreexpressió de molts gens diana, incloent proteïnes antiapoptòtiques com cFLIP, BCL2, BCL-X_L i XIAP (Perez-Galan et al., 2010). Els mecanismes d'activació d'aquesta via no estan clars, però sembla que la via de senyalització del BcR i del TNF podrien ser-ne vies mediadores (Perez-Galan et al., 2010). La recent identificació de

mutacions inactivants, delecions i hipermetilació del promotor de A20 i FAF1 (dos inhibidors d'aquesta via) ressaltava la base genètica com a possible activació de la via NF- κ B (Bea et al., 2009; Hartmann et al., 2010; Honma et al., 2009; Kawamata et al., 2009; Pinyol et al., 2007).

Recentment, mitjançant les noves tecnologies d'ultrasequenciació (RNA seq), s'ha analitzat el transcriptoma complet de 18 teixits primaris de LCM i dues línies cel·lulars i s'ha descrit que el 12% de les mostres i el 20% de les línies presenta mutacions recurrents en el gen *NOTCH1* (Kridel et al., 2012). La via de NOTCH està altament conservada i intervé en una gran varietat de processos fisiològics; proliferació, mort cel·lular, i diferenciació. La seva desregulació està implicada en trastorns del desenvolupament i oncogènesi, principalment com a promotor tumoral. Aquesta mutació també es va descriure en LLC (Puente et al., 2011) i en leucèmia limfoblàstica aguda T (T-ALL) (Weng et al., 2004) i s'associa a curta supervivència en LCM i LLC (Kopan et al. 2009). Aquest estudi evidencia que la tecnologia *next-generation sequencing* és un nou camp per explorar que permetrà descobrir noves alteracions importants en malalties complexes.

1.4.5 Factors de predicció i pronòstic

L'evolució clínic dels pacients és relativament agressiva, tot i que la supervivència mitjana és de només 3-5 anys, la resposta al tractament ha millorat en els últims anys. La remissió completa s'obté en el 60% dels pacients i el període de supervivència lliure de malaltia és curt, de manera que la majoria de pacients presenten recaigudes poc temps després de la remissió. El paràmetre amb significat pronòstic advers independent més utilitzat és l'elevat índex mitòtic relacionat amb l'elevada proliferació (proporció de cèl·lules positives per ki67), però l'edat avançada, els nivells elevats de lactat deshidrogenasa (LDH) en sèrum i els elevats nivells d'albumina sèrica, entre d'altres, són també factors clínics associats a mal pronòstic. S'ha descrit un índex pronòstic conegut com a MIPI (de l'anglès *Mantle Cell Lymphoma International Prognostic Index*), dissenyat específicament per LCM i basat en quatre factors pronòstics independents (edat, ECOG, LDH en sèrum i recompte leucocitari) (Hoster et al., 2008). Aquest paràmetre permet la classificació, més precisa, dels pacients en 3 grups de risc amb diferent supervivència. Altres estudis també demostren l'existència de factors pronòstics moleculars, per exemple, s'ha confirmat el pronòstic desfavorable de

l'elevada complexitat genòmica (Bea et al., 1999;Halldorsdottir et al., 2011b) i el tipus d'alteracions cariotípiques com són guanys a 3q i 12q i pèrdues a 8p, 9p, 9q, 13p i 17p (Parry-Jones et al., 2007;Bea et al., 1999;Martinez-Climent et al., 2001;Allen et al., 2002;Kohlhammer et al., 2004;Espinete et al., 2010;Salaverria et al., 2007;Rubio-Moscardo et al., 2005;Hartmann et al., 2010). Les mutacions a *TP53* (Halldorsdottir et al., 2011a;Hernandez et al., 1996;Louie et al., 1995;Greiner et al., 1996) i *CDKN2a* (Pinyol et al., 1997;Hutter et al., 2006), també es relacionen amb mal pronòstic mentre que segons la morfologia, les variants blàstiques i pleomòrfiques s'han associat a supervivències inferiors (Campo et al., 1999;Bea et al., 2009;Espinete et al., 2010). Per altra banda, s'ha descrit que els pacients amb LCM *in situ* poden tenir un millor pronòstic (Nodit et al., 2003).

1.4.6 Tractament

El tipus de tractament seleccionat per a un pacient de LCM depèn de l'estadi de la malaltia, l'edat i l'estat de salut general d'aquest. El LCM és difícilment curable, però en els darrers anys s'ha progressat molt en el descobriment i desenvolupament de noves teràpies i tractaments, aquests són:

- **“Vigilància i espera”**. Alguns pacients presenten un desenvolupament lent de la malaltia amb un curs clínic indolent. En aquests casos es pot diferir el tractament fins a la progressió de la malaltia fins a fases simptomàtiques, tot i que els pacients haurien d'estar molt ben controlats i vigilats (Martin et al., 2009).
- **Quimioteràpia**. Estudis recents han demostrat que la combinació dels diferents règims de quimioteràpia amb l'anticòs monoclonal rituximab anti-CD20 millora els índex de resposta i possiblement la supervivència global. Per exemple una aproximació terapèutica comú és el conegut com R-CHOP (rituximab, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina i prednisona) (Foran et al., 2000). El suplement de HiperCVAD-MTX/AraC (Budde et al., 2011) (hiperciclofosfamida fraccionada, vincristina, doxorubicina, dexametasona, metotrexat i citarabina) amb rituximab o el trasplantament amb cèl·lules mare estan obtenint resultats prometedors. Encara que aquests últims tractaments són molt intensius i de considerable toxicitat, proporciona respostes més llargues, principalment en pacients joves, comparant amb el tractament convencional de R-CHOP.

• **Inhibidors del proteasoma.** Aquestes drogues influeixen en vies moleculars crucials per a l'eliminació de proteïnes, tan en cèl·lules normals com canceroses. El bortezomib és un inhibidor que ha estat acceptat per la FDA (de l'anglès *Food and Drug Administration*) com a tractament de LCM en pacients que han rebut un tractament previ.

• **Trasplantament.** La medul·la òssia conté cèl·lules mare immadures que poden desenvolupar cap a cèl·lules sanguínies, glòbuls blancs i plaquetes. Si les dosis de quimioteràpia o radiació per eliminar les cèl·lules canceroses són molt elevades, aquesta es destruirà. Un trasplantament de cèl·lules mare ajudarà a restaurar-la. N'hi ha dos tipus: a) **al·logènic:** pacients que reben cèl·lules mare d'un donant sa. Ha estat testat en assaigs clínics en pacients joves, com a tractament de consolidació després del tractament inicial d'inducció amb quimioteràpia i rituximab. Els trasplantament amb intensitats reduïdes, coneguts com trasplantaments no mieloablatiu o mini-trasplantaments, són procediments en els que les cèl·lules mare es reben d'un donant al·logènic, però la quimioteràpia i/o la radiació administrada abans del trasplantament és menys intensa, només la suficient per permetre l'acceptació de les cèl·lules incorporades per part de l'organisme receptor. Les cèl·lules trasplantades reconeixen el càncer com a un invasor extern i activen cèl·lules del sistema immune per destruir-lo. L'aplicació d'aquesta estratègia permet evitar alguns efectes secundaris observats a altres dosis de quimioteràpia. b) **Autòleg:** amb les cèl·lules d'un mateix pacient. Hi ha debat entre els investigadors i el personal mèdic, sobre quin és el trasplantament més adequat i eficaç. En general, elevades dosis de quimioteràpia seguit d'un trasplantament és acceptat per tractar pacients que no han respost a un primer règim de quimioteràpia. Alguns pensen que el trasplantament al·logènic és millor per pacients que presenten recaiguda i que el trasplantament autòleg només s'hauria d'utilitzar com a part inicial de tractament.

Actualment hi ha altres compostos en desenvolupament i altres tractaments que s'estan investigant, com per són:

- L'ús d'agents alquilants: Bendamustina, provoca dany al DNA de cèl·lules canceroses i per tant la mort cel·lular. Es planteja el seu ús en combinació amb altres drogues.
- Antimetabòlits: Gemcitabine, interfereix en el creixement cel·lular i actualment s'està provant combinat amb bortezomib.

- Teràpies directes a Bcl-2: la proteïna Bcl-2 protegeix a les cèl·lules canceroses de la mort, de manera que s'estan provant agents simples per bloquejar l'efecte d'aquesta proteïna.
- Immunoteràpia: els anticossos monoclonals com el rituximab són un exemple d'immunoteràpia, aquests s'uneixen específicament a proteïnes diana de les cèl·lules canceroses provocant que siguin localitzades i eliminades pel sistema immune. La radioimmunoteràpia és una modificació d'aquesta aproximació, en el que una molècula radioactiva està unida a un anticòs monoclonal, quan l'anticòs reconeix les cèl·lules canceroses, la radiació les destrueix. El iodine I31 tositumomab o el Yttrium-90 ibritumomab tiuxetan són dos radioimmunoteràpics que s'han provat en alguns tipus de no Hodgkin limfomes i estan sent testats en pacients de LCM.
- Drogues immunomoduladores (IMiDs): són fàrmacs que estimulen la resposta immune dels pacients. La lenalidomida i la thalidomida són dos compostos que actualment s'estan investigant (Habermann et al., 2009).
- Inhibidors de l'mTOR: la via PI3K/mTOR/AKT és important per al creixement cel·lular, la proliferació i la supervivència. Les línies cel·lulars de LCM presenten activació constitutiva d'aquestes vies i en pacients s'ha observat una sobre-regulació de molts dels gens implicats. L'activació excessiva de la via de l'mTOR (de l'anglès *Mammalian Target of Rapamycin*) pot conduir a un creixement cel·lular excessiu, mentre que la inhibició d'aquest el pot prevenir i fins i tot provocar apoptosi. El temsirolimus n'és un exemple en desenvolupament, que indueix resposta en més d'un 40% dels LCM amb recaigudes (Ansell et al., 2008).

1.4.7 Formes indolents

Tot i el curs clínic agressiu associat a aquesta neoplàsia, recentment s'ha observat que alguns pacients diagnosticats de LCM poden tenir un curs clínic indolent, amb una llarga supervivència de més de 7-10 anys i alguns d'ells sense necessitat de tractament en el moment del diagnòstic (Espinete et al., 2005; Fernandez et al., 2010; Martin et al., 2009; Nodit et al., 2003; Orchard et al., 2003). Aquests pacients presenten algunes característiques clíniques, genètiques i moleculars que els diferencia dels LCM agressius, són tumors leucèmics amb esplenomegàlia i predominantment sense afectació ganglionar (Orchard et al., 2003; Angelopoulou et al., 2002). Aquestes formes indolents també presenten un cariotip simple, sense alteracions, a excepció de la t(11;14), present en tots els casos i l'elevat nombre de mutacions somàtiques en els gens IGHV

(Fernandez et al., 2010). L'aparició d'aquesta nova forma va plantejar el dubte de que podien correspondre a altres subtipus de limfomes esplènics o leucemitzats. Aquesta qüestió es va abordar amb un anàlisi comparatiu dels perfils d'expressió que demostrava que aquestes formes indolents eren molecularment més semblants als LCM convencionals, donant suport a la idea de que podien correspondre a la mateixa entitat. D'aquesta manera es va identificar una signatura de 13 gens diferencialment expressats entre ambdós grups: *LGALS3BP*, *CSNK1E*, *SOX11*, *KIAA1909*, *FARP1*, *PON2*, *CNN3*, *DBN1*, *HDGFRP3*, *CDK2AP1*, *HMGB3*, *SETMAR*, *CNR1* y *RNGTT* (Fernandez et al., 2010) (Figura 12).

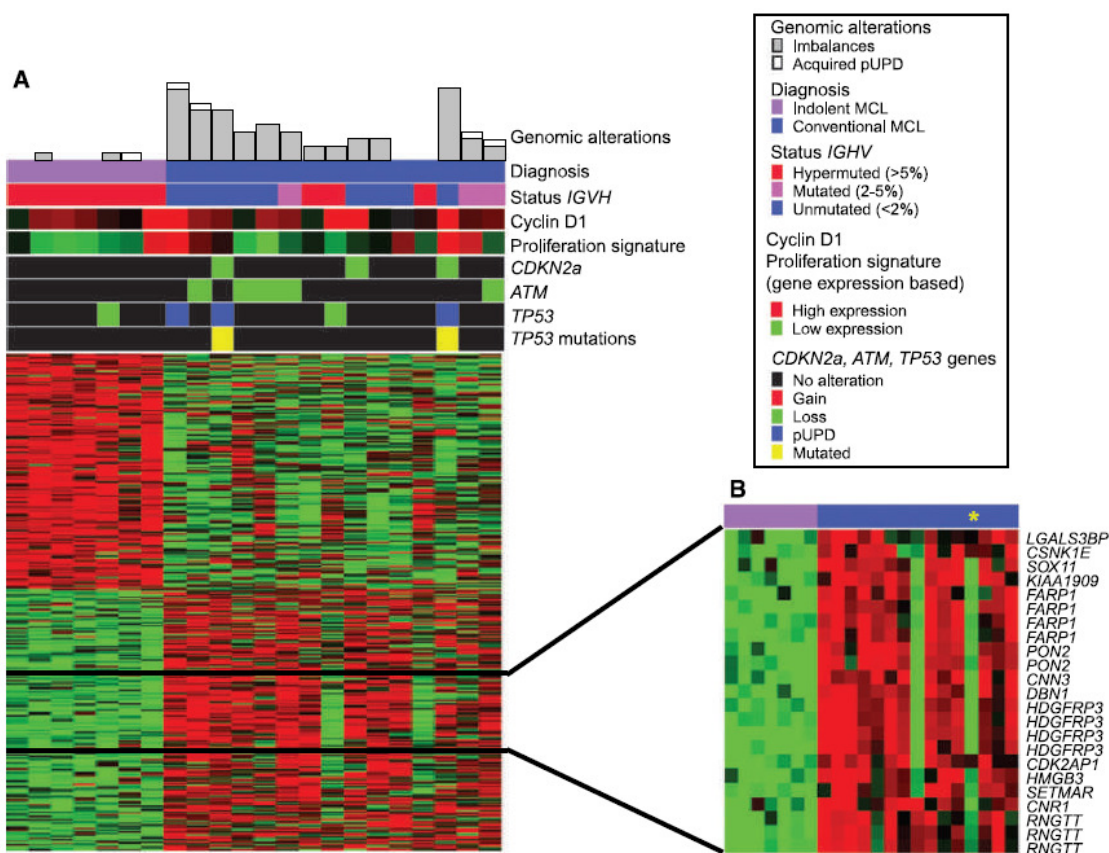


Figura 12. Perfil d'expressió diferencial entre LCM indolents i convencionals, i descripció de les característiques genètiques i moleculars. A la part superior, el diagrama de barres reflexa la complexitat genòmica mitjançant el nombre d'alteracions per cas. A la part inferior, el *heat map* mostra l'expressió diferencial dels gens més significatius. En verd es representa la infraexpressió i en vermell la sobreexpressió. B) *Heat map* de les sondes més diferencialment expressades, seleccionades per a posteriors estudis.

HETEROGENÏTAT EN EL LIMFOMA DE LES CÈL·LULES DEL MANTELL

La conducta clínic i biològica dels pacients de LCM presenta una àmplia heterogeneïtat. La morfologia, l'immunofenotip i el genotip no són suficients per explicar aquesta diversitat, de manera que es requereix d'altres aspectes, desconeguts fins al moment, que ens ajudin a entendre aquesta gran varietat i ens permetin millorar la caracterització d'aquests pacients.

1.5 IMMUNOGLOBULINES EN EL LCM

1.5.1 Evidència d'estimulació antigènica

L'anàlisi immunogènec dels receptors de les cèl·lules B (BcR) de diferents neoplàsies limfoides ha permès fer importants contribucions cap a la comprensió de la ontogènia d'aquestes malalties, l'obtenció d'evidències d'una possible participació de processos de selecció antigènica, així com la identificació de subtipus biològics amb les seves conseqüències clíniques. Les seqüències de les IG són relativament fàcils d'analitzar i no només es poden utilitzar com a marcador de rastreig per a la detecció del tumor, sinó que també revelen la història clonal de les cèl·lules, des de la seva cèl·lula B parental fins més enllà a través de la seva transformació.

La LLC ha estat àmpliament estudiada en aquest àmbit degut a la rellevància clínic de les troballes. Els BcR d'aquesta neoplàsia identifiquen subgrups de pacients amb diferent presentació clínic i supervivència, diferents perfils genòmics, metilació global del DNA, expressió de miRs i senyalització cel·lular, indicant que la reactivitat dels BcR per un antigen funcional està críticament relacionada amb el comportament biològic dels clons malignes (Chiorazzi & Ferrarini, 2011; Hamblin et al., 1999; Maura et al., 2011; Murray et al., 2008; Szankasi & Bahler, 2010). Als anys '90 dos grups van demostrar, de manera independent, que dos pacients (no relacionats) de LLC presentaven molta similitud a la regió VH CDR3, suggerint que el mateix antigen podria haver estat involucrat en la diversificació i el procés de selecció (Efremov et al., 1996; Johnson et al., 1997; Widhopf & Kipps, 2001). L'existència d'aquests reordenaments prototipats (corroborat per Fais *et al.* al 1998 (Fais et al., 1998)) i repertoris IGHV restringits i no aleatoris, va fer que s'introduís el concepte d'**estereotip** (Messmer et al., 2004). Els BcR d'un mateix estereotip són similars, sovint amb l'ús de les mateixes cadenes pesades i lleugeres, i amb característiques estructurals del VH

CDR3 molt semblants (longitud, composició aminoacídica, aminoàcids dels llocs d'unió...). En conjunt, aquestes troballes immunogèniques sustenten fermament la idea de que la LLC no és un procés estocàstic de les cèl·lules B madures, sinó que podria ser un procés impulsat per antígens, de manera que els processos d'estimulació antigènica podrien promoure l'expansió dels clons tumorals.

El LCM comparteix determinades analogies fenotípiques i biològiques amb la LLC (Swerdlow et al., 2008). Es va demostrar que els LCM tenien un BcR somàticament mutat amb una forta restricció de l'ús de determinats gens IGHV, també observat en d'altres síndromes limfoproliferatives (Aarts et al., 1998; Ottensmeier et al., 1998; Stamatopoulos et al., 1999; Thompsett et al., 1999), i la presència de patrons prototipats (Hadzidimitriou et al., 2011). No obstant, i a diferència de la LLC, existeix certa controvèrsia en les implicacions clíniques d'aquests anàlisis en LCM. Tot i que s'ha demostrat que els pacients amb elevada càrrega mutacional en els gens IGHV tendeixen a tenir una millor supervivència (Camacho et al., 2003; Kienle et al., 2003; Orchard et al., 2003), la majoria d'estudis no han trobat cap relació entre l'estat mutacional d'aquests gens i l'evolució de la malaltia (Cogliatti et al., 2005; Schraders et al., 2009). Degut a les observacions d'aquestes discrepàncies seria interessant realitzar estudis per poder respondre i aclarir aquestes qüestions, així com determinar possibles nous mecanismes de patogènesi, tal i com s'han descrit en LLC.

1.6 EXPRESSIÓ DE SOX11 EN EL LCM

1.6.1 Limfoma de cèl·lules del mantell ciclina D1 negatiu

La detecció de ciclina D1 deguda a la presència de la translocació és la clau del diagnòstic d'aquesta entitat. Tot i això, un petit subgrup de tumors amb la morfologia i el fenotip de LCM convencional són negatius per l'expressió de ciclina D1 i la presència de la t(11;14). Encara que el nombre de casos estudiats és limitant, el perfil d'expressió global i les alteracions genètiques secundàries d'aquests tumors és indistingible dels que expressen ciclina D1, suggerint que poden correspondre a la mateixa entitat (Fu et al., 2005; Quintanilla-Martinez et al., 2009; Salaverria et al., 2007). Alguns LCM ciclina D1 negatius expressen elevats nivells de ciclina D2 i D3, en alguns casos associat a translocacions cromosòmiques que impliquen el gen de les IG (Gesik et

al., 2006;Wlodarska et al., 2008;Shiller et al., 2011). L'elevada expressió d'aquestes ciclines no és exclusiva de LCM donat que també s'expressen en altres limfomes. A més, degut a limitacions tècniques, mitjançant immunohistoquímica (IHQ) no és possible discriminar amb precisió diferents nivells d'expressió (Quintanilla-Martinez et al., 2009;Salaverria et al., 2007). De la recerca d'un nou biomarcador que permetés identificar els casos LCM ciclina D1 negatius es va identificar *SOX11* com a una veritable eina de diagnòstic d'aquests tumors a la pràctica clínica (Mozos et al., 2009) (Figura 13). *SOX11* és un factor de transcripció neuronal aparentment no expressat en cap llinatge de cèl·lules hematopoètiques però altament expressat en més del 90% dels LCM. De manera interessant, aquest no està expressat en altres neoplàsies limfoides, a excepció d'alguns limfomes de Burkitt (LB) i limfomes limfoblàstics (LLB), però a baixos nivells (Dictor et al., 2009;Mozos et al., 2009).

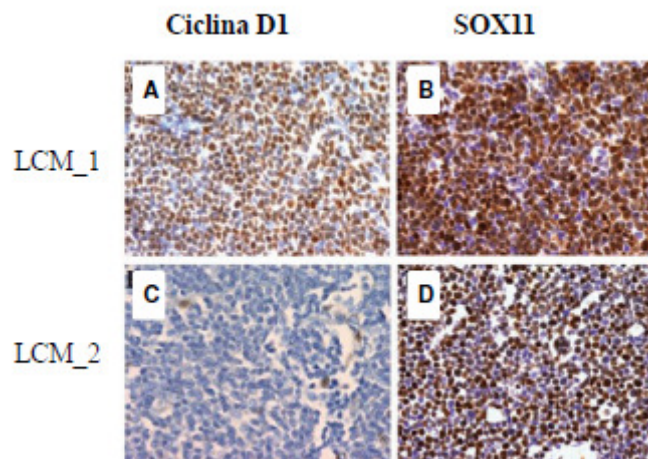


Figura 13. Anàlisi immunohistoquímica de ciclina D1 i SOX11 en un cas LCM convencional (LCM_1) i un LCM ciclina D1 negatiu (LCM_2). Només el LCM_1 presenta expressió de ciclina D1 (panell A i C), però ambdós tumors mostren tinció nuclear, i en conseqüència positiva, de SOX11 (panells B i D).

1.6.2 *SOX11*: descripció i funció

El gen *SOX11* està mapat a 2q25.3 (Jay et al., 1995) i pertany al subgrup C que inclou tres membres: *SOX4*, *SOX11* i *SOX12*. Aquests 3 gens estan co-expressats en progenitors embrionics neuronals i cèl·lules mesenquimals de molts òrgans en desenvolupament. La proteïna humana de SOX11 té 441 aminoàcids i un pes molecular de 46.7 kDa, conté dos dominis funcionals: un domini d'unió al DNA, del tipus HMG (de l'anglès *High Mobility Group*) localitzat a l'extrem N-terminal i un domini de transactivació (TAD) a l'extrem C-terminal (Dy et al., 2008;Penzo-Mendez, 2010). Degut a l'estructura

helicoidal del domini TAD, *SOX11* activa la transcripció de manera més eficient que els altres membres del grup. Tant *SOX11* com *SOX4* estan altament expressats en medul·loblastoma, oligodendrogliomes anaplàstics i gliomes (Lee et al., 2002; Weigle et al., 2005) i tenen un paper clau en el desenvolupament cardíac i neuronal, entre d'altres, tot i que la funció molecular, així com el paper de *SOX12* segueixen sent desconeguts. Mitjançant qPCR s'ha confirmat l'expressió de *SOX11* en el cervell de fetus, però molts òrgans i teixits d'adults (melsa, timus, pròstata, colon, cervell...) són negatius per l'mRNA d'aquest gen (Weigle et al., 2005).

Les evidències suggereixen que *SOX11* és crític per la neurogènesi embrionària i la remodelació de teixits (Cheung et al., 2000; Hargrave et al., 1997). Normalment s'expressa durant el desenvolupament del sistema nerviós d'embrions humans i és necessari per la supervivència de neurones i el creixement de neurites (Bergsland et al., 2006; Jay et al., 1995). *SOX4* és l'únic gen de la família de SOX que s'ha vist expressat en etapes inicials del desenvolupament de cèl·lules B i T (Schilham et al., 1996; van de et al., 1993). Els ratolins deficientes per *SOX4* tenen el desenvolupament de cèl·lules B bloquejat en fase pro-B (Schilham et al., 1996), de manera que l'expressió d'aquest gen és crucial per a la limfopoesi de cèl·lules B (Schilham et al., 1996; van de et al., 1993). *SOX11* comparteix amb *SOX4* el 55% i el 86% de la identitat aminoacídica del domini TAD i el domini HMG, respectivament (Dy et al., 2008), però encara no està clara la seva implicació en limfomagènesi.

1.6.3 *SOX11* en oncogènesi i neoplàsies limfoides

La primera vegada que es relaciona SOX amb algun tipus de càncer va ser al 2002 quan Lee *i col.* (Lee et al., 2002) van demostrar que *SOX4* i *SOX11* estaven expressats en medul·loblastomes desmoplàstics, que presentaven millor pronòstic que els medul·loblastomes clàssics (Lee et al., 2002). Al 2008 es va associar l'expressió de *SOX11* amb LCM (Ek et al., 2008), leucèmies i limfomes B/T limfoblàstics i amb un baix percentatge de limfomes de Burkitt (Dictor et al., 2009), i es va suggerir la seva implicació en la transformació maligna i la supervivència cel·lular. En un estudi posterior, es va analitzar *SOX11* en 211 neoplàsies de cèl·lula B per immunohistoquímica i es va observar que la tinció nuclear d'aquest factor de transcripció estava altament associada a LCM però era independent de la translocació t(11;14) en altres neoplàsies de cèl·lula B no-LCM (Chen et al., 2010). El 50% de les tricoleucèmies també presenten tinció nuclear positiva de *SOX11* associada a

l'expressió de ciclina D1, suggerint que *SOX11* podria estar involucrat en la seva regulació.

Estudis de silenciament i sobreexpressió ectòpica de *SOX11* en línies cel·lulars de glioma (NSCL61) i models *in vivo* van demostrar el paper preventiu en la tumorigènesi del factor de transcripció (Hide et al., 2009). A més, anàlisis de promotors revelen que en limfomes de cèl·lula B, *SOX11* és silenciada a través de la metilació del DNA, suggerint que es troba sota control de regulació epigenètica. En relació a aquesta idea en un estudi es va correlacionar l'expressió de *SOX11* amb la no metilació del DNA i amb la presència de marques d'activació d'histones (H3K9/14Ac i H3K4me3) en cèl·lules mare embrionàries i algunes neoplàsies de cèl·lula B agressives (Vegliante et al., 2011). Aquest factor de transcripció també s'ha vist associat a la regulació d'un complex programa de la cromatina, provocant canvis en l'expressió gènica, però se'n desconeixen les seves dianes transcripcionals.

De manera que les últimes publicacions suggereixen que *SOX11* en neoplàsies hematològiques podria actuar com a gen supressor de tumors (Gustavsson et al., 2010).

Així doncs, *SOX11* en LCM, a part de descriure's com a marcador tumoral de la neoplàsia i tenir un paper rellevant en el diagnòstic, adopta importància clínica i biològica. A través d'anàlisis d'arrays d'expressió, Fernández *i col.* (Fernandez et al., 2010) van identificar 13 gens diferencialment expressats en dos subgrups de LCM, entre els quals s'incloïen *SOX11*, *HDGFRP3*, *HMG3* i *DBN1* (Figura 12). Un dels subgrups de pacients fou negatiu en quan a l'expressió d'aquesta signatura de gens. Els pacients d'aquest subgrup es caracteritzaven per tenir un curs clínic indolent i asimptomàtic, presentació leucèmica, poques o cap alteració genètica i no requerien tractament. Aquest subgrup se'l coneix com a **LCM indolents *SOX11* negatius** i presentaven una millor supervivència que els LCM convencionals *SOX11* positius (Fernandez et al., 2010). Però existeixen altres publicacions que generen certa controvèrsia, demostrant que els LCM *SOX11* negatius tenen pitjor pronòstic que els *SOX11* positius (Wang et al., 2008b), i considerant per tant, que els casos indolents (que corresponen a un 9% de la sèrie analitzada) són *SOX11* positius (Nygren et al., 2012).

Aquestes troballes han de ser confirmades per poder valorar exactament la funció de *SOX11* en aquests casos. L'anticòs de *SOX11* per avaluar la seva expressió mitjançant IHQ està donant bons resultats, de manera que la seva aplicació s'està extenent per

ajudar a confirmar el diagnòstic de LCM. Però una gran proporció dels pacients de LCM, principalment les formes indolents, són leucèmics i sense afectació ganglionar de manera que *SOX11* no pot ser avaluat per IHQ. Aquest fet fa que sigui necessari el desenvolupament de nous mètodes o estratègies per a la detecció d'aquest gen i el correcte diagnòstic d'aquests pacients per al posterior tractament i seguiment.

1.7 MICRORNAS EN LCM

Els microRNAs (miRs) són petites molècules d'RNA endogen que no codifiquen per cap proteïna i que actuen com a molècules reguladores de l'expressió gènica. Juguen un paper regulador essencial en animals i plantes unint-se a RNAs missatgers i inhibint la seva traducció a proteïna. L'any 1993, el grup de Lee *i col.* (Lee et al., 1993), van trobar un mutant de *C. elegans* que presentava problemes en el curs temporal de l'expressió de diferents gens essencials per al desenvolupament. El gen mutat, al qual van anomenar *lin-4*, no codificava per cap proteïna sinó que el seu producte era un RNA petit que s'unia a les regions 3' no traduïdes d'alguns gens implicats en el desenvolupament del nematode, conegudes com *lin-14* (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993). Ruvkun *i col.* (Ha et al., 1996) van poder comprovar que hi havia una disminució de la quantitat de proteïna sense que hi hagués una reducció dels nivells d'mRNA. Aquest RNA petit, *lin-4*, va ser el primer membre fundador dels microRNAs, i actualment sabem que molts organismes multicel·lulars expressen centenars d'aquestes molècules.

1.7.1 Biogènesi dels microRNAs

Els RNAs no codificants engloben diferents subtipus de molècules d'RNA, moltes d'elles implicades en la regulació de l'expressió gènica. En aquesta classificació d'RNAs no codificants hi trobem els microRNAs, que es caracteritzen per la seva curta llargada (19-25 nucleòtids) i perquè són gens transcrits a partir de DNA, però que finalment no són traduïts a proteïna. Un 25% es troba codificat en introns de gens i típicament es codifiquen en la mateixa orientació de la transcripció de la cadena promotora, indicant que la transcripció de gen del miR està conduïda pel promotor de l'mRNA.

Els miRs porten un grup fosfat en l'extrem 5' i un grup hidroxil en el 3', i són transcrits per l'RNA polimerasa II que produeix una molècula llarga (>1Kb) coneguda com miRNA primari (o **pri-miRNA**). La seqüència d'aquest inclou la regió del miR i una

altra regió complementària a l'anterior, de manera que permet el seu aparellament i la formació d'una estructura de *hairpin stem-loop* (Figura 14) que és tallada per l'endonucleasa RNasa II coneguda amb el nom de Drosha, que està associada a la proteïna DGCR8 (en mamífers) o Pasha (en *Drosophila* y *C. elegans*). Aquest complex microprocessador s'encarrega de tallar de forma asimètrica les dues cadenes formant un nou precursor de 60-70 nucleòtids conegut com **pre-miRNA** (Figura 14).

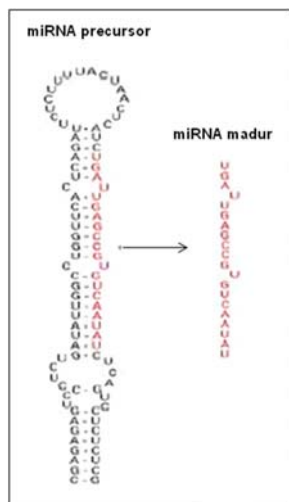


Figura 14. Estructura de *hairpin stem-loop* del pre-miRNA, en vermell la seqüència del que serà la forma madura del miR.

Aquests són exportats al citoplasma de forma activa a través del complex dependent d'RNA-GTP, Exportina 5 (Lund et al., 2004) i un cop allà l'endonucleasa RNasa II DICER, associada a TRBP i PACT (en mamífers), els processa donant lloc a una molècula de doble cadena amb projeccions de 1 a 4 nucleòtids a qualsevol dels extrems. De manera que es generen dues molècules curtes i complementàries d'RNA, però només una d'elles serà integrada en el RISC (complex encarregat del silenciament dels gens) i donarà el miR madur. Sembla ser que la selecció de la cadena activa provinent del dsRNA es basa en l'estabilitat dels extrems de la doble cadena, és a dir, la cadena amb més baixa estabilitat en els 1-4 pb de l'extrem 5' s'associarà preferencialment a RISC i es convertirà en la cadena activa que es coneix com a **cadena guia**. L'altra cadena, coneguda com **anti-guia**, serà degradada. Aquesta selecció es porta a terme a través de la proteïna Argonauta (RNasa catalíticament activa del complex RISC). Després de la integració amb RISC, els miRs s'associen per complementarietat a les molècules d'mRNA, promovent el tall de la diana o bé bloquejant l'mRNA impedit la seva traducció i per tant, la conseqüent producció de proteïna.

1.7.2 Mecanismes d'acció dels microRNAs

Els miRNAs poden regular negativament l'expressió gènica a través de dos mecanismes principals: la degradació de l'mRNA diana o mitjançant la repressió traduccional (Figura 15). L'ús d'un o altre mecanisme dependrà de la complementarietat del miRNA amb la seva diana: si la complementarietat és elevada o total es produeix la degradació, en canvi, si és parcial o insuficient es donarà inhibició de la traducció. Doench i Sharp (Doench & Sharp, 2004) van demostrar que un miRNA podia actuar en moltes zones 3'UTR d'un gran nombre de gens i podia inhibir molts mRNA diana que continguessin seqüències complementàries a les posicions 2-7 de l'extrem 5' d'un miRNA, regió coneguda com *seed sequence* (Lim et al., 2005). Hi ha un tercer mecanisme d'acció dels miRs ja que alguns poden unir-se al DNA i realitzar, no només repressió postranscripcional, sinó també repressió transcripcional per silenciament de la cromatina (Chen et al., 2004)(Figura 15).

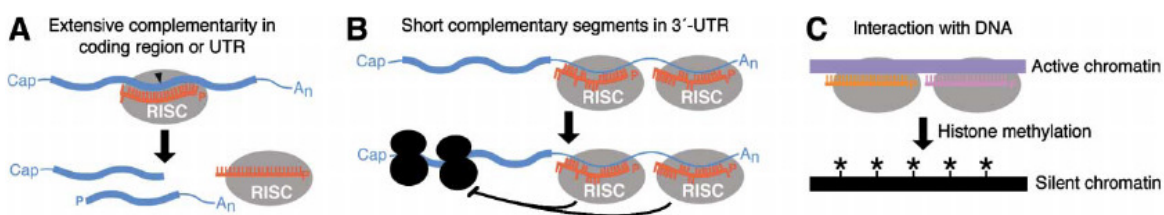


Figura 15. Mecanismes d'acció dels miRNA. A) Destructió de l'mRNA, B) Inhibició de la traducció i C) Interacció amb el DNA

Diferents estudis han demostrat la important contribució dels miRs en la regulació de processos cel·lulars, incloent la coordinació de la proliferació, la diferenciació i l'apoptosi durant l'hematopoesi i el desenvolupament embrionari.

1.7.3 MicroRNAs i oncogènesi

Donada la participació dels miRs en la regulació de processos cel·lulars que es veuen alterats en la transformació neoplàstica, la desregulació d'alguns d'aquests RNAs pot jugar un paper important en l'aparició i la progressió tumoral (Taula 3).

Òrgan	Tipus de malaltia	miRs sobreexpressats	miRs infraexpressats
Fetge	HCA and HNF	224	122a, 422b, 203, 200c
	HCC	21, 224, 10b, 221, 222, 20, 18	199a, 199b, 200b, 223, 122, 214, 145, 150
	Colangiocarcinomes	21, 23a, 141, 200b, 27a	
Pàncrees	TEP	23a, 342, 26a, 30d, 26b, 103,	155, 326, 339, 326
	CCAP	23a, 342, 26a, 30d, 26b, 103,	155, 326, 339, 326
	Adenocarcinomes ductals	21, 221, 181a, 155, 222, 181b, 107	148a, 375
Esòfag	CCEE	25, 424, 151	100, 99, 29c, 140, 205, 203, 202
Estómac	Adenocarcinomes	21, 223, 25, 17-5p, 125b, 181b, 106a, 107, 92, 103, 221, 93, 100, 106b	136, 218, 212, 96, 339
Colon	Adenomes	21	
	Adenocarcinomes	21, 92, 20a, 106a, 92, 223, 203	
Ovari	Carcinomes	200a, 200c	let-7d, 100, 101, 105, 125a, 125b, 126, 133a, 137, 140, 143, 147, 199a, 199b, 224, 9, 9*, 99a
Pit	Carcinomes	155, 21	125b, 145, 10b
Pulmó	NSCLC	21, 191, 155, 210	126, 224
Pròstata	Carcinomes	32, 182, 31, 26a, 200c	494, 490, 133a, 1, 218, 220, 128a
Tiroides	Carcinomes papil·lars	221, 221, 146a, 181b	
	Carcinomes anaplàstics		125b, 26a, 30a-5p

Taula 3. Exemples de desregulacions de miRs causants de malalties que afecten a diferents òrgans. (Abreviatures: CCAP: carcinoma de les cèl·lules acinars pancreàtiques, CCEE: carcinoma de les cèl·lules escamoses de l'esòfag, HCA: hepatocarcinoma cel·lular, HNF; Hiperplàsia nodular focal, NSCLC: càncer de pulmó de cèl·lules no-petites, TEP: tumors endocrins pancreàtic).

Actualment en el model proposat, els miRs rellevants en càncer poden actuar tant com a oncògens (reprimint l'expressió d'altres gens supressors de tumors (GST)), coneguts com a **oncomiRs**, o pròpiament com a GST, depenent del paper oncogènic dels seus transcrits diana (Figura 16). En càncer s'han descrit diversos tipus d'alteracions genòmiques que afecten a loci de miRs, incloent guanys/amplificacions, pèrdues i translocacions de diverses regions cromosòmiques i també canvis en la metilació dels promotors, que tenen com a conseqüència canvis en la dosi gènica i en l'expressió d'aquests, respectivament. Estudis recents han demostrat que aproximadament la meitat dels loci dels miRs estan localitzats en regions associades a llocs fràgils de cromosomes humans i regions implicades en càncer (Calin et al., 2004b). Tot això suggereix que les alteracions cromosòmiques que afecten als loci dels miRs poden ser esdeveniments causals freqüents de la desregulació dels miRs, amb una possible rellevància per a la tumorigènesi.

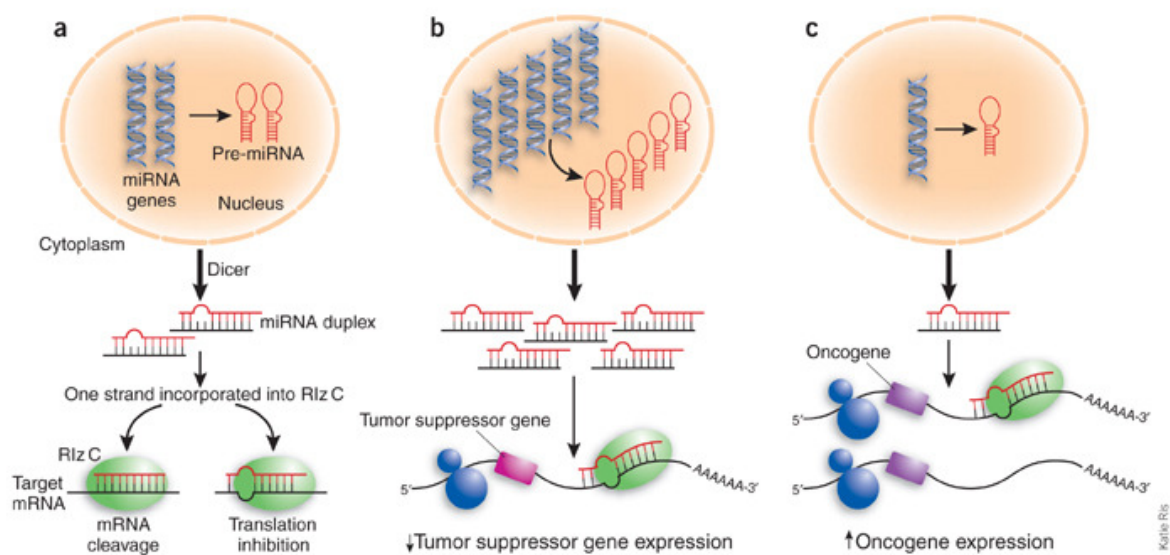


Figura 16. Model de participació dels miRs en càncer mitjançant la modulació de l'expressió de GST i oncògens. A) Situació normal. Els pri-miRNAs són processats en pre-miRNAs en el nucli. Aquests són exportats al citoplasma per degradar l'mRNA o inhibir-ne la traducció; B) Sobrexpressió del miRNA per ampliació del locus, que podria conduir a una disminució de l'expressió del gen diana, com per exemple un GST; C) Infraexpressió del miRNA, per deleció o metilació del locus del miRNA, que podria suposar un increment de l'expressió del gen, per exemple, un oncogen.

1.7.4 MicroRNAs i neoplàsies limfoides

Estudi dels miRs en leucèmies. Els estudis s'han centrat bàsicament en la LLC. Un estudi de 38 pacients va mostrar diferències en l'expressió associades a determinades alteracions genètiques i a la presència de mutacions en IGHV i l'expressió ZAP-70 (Calin et al., 2004a). A més, es va observar que els nivells del miR-15a i miR-16-1, que estaven codificats en la regió 13q14 (delecionada en el 65% dels casos de LLC) estaven infraexpressats en el 75% dels casos portadors d'aquesta deleció. Es va suggerir que aquests miRs actuaven sobre BCL2 induint apoptosi *in vitro*, fet que suggereix que podrien jugar un paper com a GST en la LLC (Cimmino et al., 2005). Un altre estudi del mateix grup defineix una signatura de 13 miRNAs amb significat pronòstic i associada a progressió en la LLC (Calin et al., 2005). També s'ha descrit la relació entre el miR-29 i el miR-181b amb la regulació de l'oncogen *TCL1*, que prèviament es va relacionar amb un fenotip agressiu en aquesta mateixa neoplàsia (Pekarsky et al., 2006).

Estudi dels miRs en limfomes. L'anàlisi s'ha focalitzat pràcticament en 2 grans grups: el miR-155 i els components del clúster miR-17-92 (miR-17, miR-18, miR-19a, miR-19b, miR-20a i miR-92), ambdós amb un paper important en la limfomagènesi. Anàlisis funcionals i bioinformàtics dels gens diana del **miR-155** demostraven que aquest podria actuar promovent la diferenciació de les cèl·lules progenitores primerenques cap a estadis més madurs i que controlava la diferenciació mieloide i eritrocitària (Georgantas, III et al., 2007). Inicialment, van der Berg *i col.* (van den et al., 2003) van observar que *BIC* estava altament expressat en un 90% dels casos de limfoma de Hodgkin. Posteriorment Metzler *i col.* (Metzler et al., 2004) van proposar que la regió filogenètica conservada de 138 nucleòtids codificada dins del gen *BIC*, donava lloc a la seqüència precursora del miR-155. Posteriorment, es va veure que ambdós transcrits, *BIC* i miR-155, també es trobaven sobreexpressats en limfoma difús de cèl·lules grans (DLBCL) (Eis et al., 2005). De manera similar es va descriure la sobreexpressió d'ambdós en el limfoma de Hodgkin i en limfomes mediastínics primaris de cèl·lula B (Kluiver et al., 2006). A més del paper proposat pel miR-155 en l'hematopoesi, aquest també s'ha trobat sobreexpressat durant la resposta inflamatòria de macròfags (O'Connell et al., 2007) i en limfòcits reactius.

Una amplificació genòmica comú en els limfomes de cèl·lula B és la regió 13q31. Aquesta conté la seqüència precursora del **clúster del miR-17-92**, que inclou les seqüències de 7 miRNAs madurs (He et al., 2005). Els miRNAs que componen aquest

clúster estan sobreexpressats en 4 línies cel·lulars amb aquesta amplificació, en comparació amb 5 línies cel·lulars que no la presentaven. A la vegada, es va observar que el 65% de casos de limfomes, sobreexpressava aquest clúster. Segons el que s'ha observat en ratolins, la seva sobreexpressió accelera el procés de limfomagènesi (He et al., 2005), bàsicament suprimint la mort cel·lular. Per altra banda, quan s'expressen tots els microRNAs del clúster en conjunt, però no com a miRNAs individuals s'incrementa limfomagènesi, suggerint que aquests poden tenir un efecte cooperatiu. Sembla que la seva sobreexpressió ve donada per la unió a *MYC* (O'Donnell et al., 2005) i el seu efecte es produeix a través del factor de transcripció pro-apoptòtic *E2F1*.

Altres exemples de miRs que actuen com a GST i/o oncògens en leucèmies i limfomes estan descrits a la taula 4.

Així doncs i de manera general, els perfils d'expressió de miRs en limfomes i altres tumors humans (Volinia et al., 2012; de Oliveira et al., 2012) han permès identificar signatures específiques de diferents subtipus diagnòstics i/o estratificar els pacients en grups de significat pronòstic. Considerem important l'exploració d'aquest camp en LCM ja que podria explicar part de l'heterogeneïtat que presenta aquesta neoplàsia.

miR	Limfoma	Alteració	Diana	Funció
Let-7a	DLBCL, cHL	Sobre i Infra regulació	<i>PRDM1, BLIMP</i>	Diferenciació cap a cèl·lula plasmàtica, oncomir
9 (família)	DLBCL, cHL	Sobre-regulació	<i>PRDM1, BLIMP</i>	Diferenciació cap a cèl·lula plasmàtica, oncomir
15a/16 clúster	LLC, LCM, MM	Infra-regulació per deleció i mutacions puntuals	<i>BCL2, WT1, WNT3A, CCND1, MCL1, ETS, RAB9B, PDC6IP, AKT3, S6, MAP3KIP3</i>	Inhibició proliferació, apoptosi, supressió de tumors
17-91 clúster	LB, DLBCL, LCM, MM	Sobre-regulació per amplificació	<i>BIM, PTEN, c-Myc, E2F1, E2F3, SOCS1, CDKN1A, CCND1</i>	Desenvolupament limfoide B i T, proliferació, supervivència, oncomir.
21	DLBCL, MM, LLC	Sobre-regulació	<i>PTEN</i>	Oncomir
23a/b	LB, LLC	Sobre-regulació	<i>GLS2</i>	Proliferació del cèl·lules B
25	MM	Sobre-regulació	<i>PCAF</i>	Oncomir
26a	LB	Expressió de c-Myc	<i>EZH2</i>	Supressor de tumors
29 (família)	LLC, LCM, LZME	Infra-regulació	<i>TCL1, MCL1, CDK6</i>	Supressor de tumors
32	MM	Sobre-regulació	<i>PCAF</i>	Oncomir
34 (família)	LLC, LB	Infra-regulació	<i>CCND1, FoxP1, CDK4/6, CCNE, E2F3, TCL1</i>	Diferenciació de cèl·lula B
93	MM	Sobre-regulació	<i>PCAF</i>	Oncomir
106 (família)	MM, DLBCL, LLC	Sobre-regulació	<i>PCAF</i>	Oncomir
127	LB, DLBCL	Sobre-regulació	<i>BLIMP1, XBPI, BCL6</i>	Oncomir i diferenciació de limfòcits
135a	LLC	Infra-regulació	<i>JAK2</i>	Supervivència
143	LLC, DLBCL, LB	Infra-regulació	<i>ERK5, DNMT3A</i>	Supressor de tumors
146a	LB, LLC	Sobre-regulació	<i>IRF7</i>	Oncomir
150	LLC, LCM	Sobre-regulació LLC) i Infra-regulació (LCM)	<i>MYB</i>	Diferenciació cèl·lules B
155	DLBCL, LLC, LB, LCM, cHL	Sobre-regulació	<i>c-MAF, AID, SOCS1, JARID2, CCND1, SMAD5, SHIP1</i>	Oncomir, funcionalitat de cèl·lules B i T
181a	LLC, MM, LCM	Infra-regulació i sobre-regulació (MM i LLC)	<i>DUSP5, DUSP6, SHP2, PTPN232, TCL1, PLAG1, PCAF</i>	Desenvolupament de cèl·lules T, oncomir
195	LLC	Sobre-regulació	<i>CCND1</i>	Regulació post-transcripcional CCND1
203	Limfoma T	Infra-regulació	<i>ABL</i>	Oncomir
221/222	MM, LLC	Sobre-regulació (MM) i Infra-regulació (LLC)	<i>KIT, PLK2, CDKN1B, família HOX</i>	Desenvolupament cèl·lules limfoides, oncomir

Taula 4. MiRs relacionats amb el desenvolupament tumoral de leucèmies i limfomes.

2. HIPÒTESI I OBJECTIUS

2.1 Hipòtesi

El limfoma de les cèl·lules del mantell (LCM) és una neoplàsia heterogènia en relació a les característiques clíniques, biològiques i moleculars que presenten els pacients. Per tal d'augmentar la precisió biològica, la capacitat pronòstica, així com el maneig clínic dels pacients, és important caracteritzar a tots els nivells aquesta patologia, incidint en l'estudi del nou subgrup de LCM, que es caracteritza per tenir un curs clínic indolent.

Segons els estudis recents en la LLC i altres neoplàsies limfoides sembla ser que l'anàlisi dels gens de les IG, l'expressió de SOX11 i el perfil d'expressió de miRNAs ens podrien ajudar a caracteritzar aquesta heterogeneïtat.

2.2 Objectius

S'ha abordat la hipòtesi plantejada a partir de diferents projectes amb els següents objectius concrets:

1. Determinar si dels gens de les immunoglobulines en pacients de LCM es relacionen amb paràmetres clínic-patològics i moleculars:
 - a. Avaluar si l'estat mutacional dels gens IGHV ens permet classificar dos subgrups de LCM en funció de la supervivència, tal com s'ha observat en la LLC.
 - b. Determinar si les restriccions en el repertori de les IG en una sèrie ampla de pacients de LCM es relacionen amb el pronòstic dels mateixos.
 - c. Determinar la relació entre l'estat mutacional del gens de les IG amb l'expressió de SOX11.
 - d. Caracteritzar el perfil d'expressió gènica de casos LCM amb IG mutades i no mutades amb arrays d'expressió gènica i analitzar l'enriquiment de gens involucrats en vies determinades, així com establir una possible cèl·lula d'origen del LCM.

2. Definir criteris que ens puguin ajudar al reconeixement dels pacients de LCM amb un curs clínic indolent i determinar si corresponen a una subentitat diferent de la malaltia.
 - a. Dissenyar i desenvolupar un assaig simple, mitjançant qPCR, utilitzant 3 gens de la signatura descrita (*SOX11*, *HDGFRP3* i *DBNI*), per intentar desenvolupar una eina de diagnòstic rutinari i suplir les mancances de la IHQ.
 - b. Correlacionar l'expressió d'aquests gens amb la supervivència i d'altres paràmetres clínic-patològics i moleculars.
 - c. Estudiar si l'expressió d'aquests gens diferencials es manté estable en el temps, en mostres de LCM progressades.
 - d. Determinar els perfils d'alteracions genètiques i la complexitat genòmica en els diferents subgrups de LCM (indolents i convencionals).

3. Avaluar si els perfils d'expressió de microRNAs podrien ser a marcadors potencialment útils de paràmetres clínic-patològics i/o biològics en LCM.
 - a. Determinar per qPCR els perfils d'expressió de 86 miRs localitzats en regions freqüentment alterades en línies cel·lulars de LCM i mostres de tumors primaris.
 - b. Correlacionar l'expressió dels miRs amb les característiques clínic-patològiques dels pacients, així com d'altres paràmetres moleculars.

3. MATERIAL I MÈTODES

3.1 ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ DE GENS

3.1.1 Reacció en cadena de la polimerasa

L'objectiu de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) és obtenir un gran número de còpies d'un fragment de DNA particular dels quals se'n coneix part de la seqüència nucleotídica (Figura 17). La PCR convencional consta de 4 etapes, inicialització, desnaturalització, hibridació i extensió, de les quals les 3 últimes, es van repetint al llarg de tot el procés.

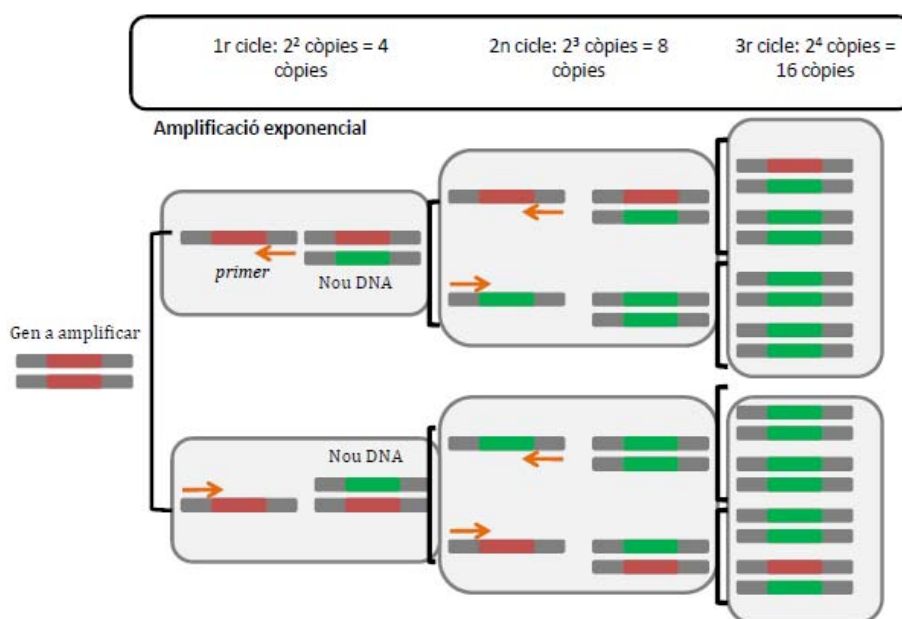


Figura 17. Model esquemàtic del procés de la PCR.

Existeixen diferents tipus de PCR: aniuada, *in situ*, múltiplex, en transcriptasa inversa, de temps real, etc, però totes comparteixen el mateix principi. En aquesta tesi s'ha utilitzat aquesta tècnica principalment per l'anàlisi de l'estat mutacional dels gens IGHV i TP53.

3.1.2 PCR quantitativa a temps real

La PCR quantitativa (qPCR) a temps real és una variant de la PCR convencional, utilitzada per amplificar i quantificar de manera absoluta o relativa el producte de l'amplificació. Es requereixen els mateixos reactius que per a la PCR convencional i sondes d'hidròlisi. Aquestes són oligonucleòtids marcats amb un fluorocrom **donador** (*reporter*) a l'extrem 5', que emet fluorescència al ésser excitat, i un **acceptor**

(*quencher*), a l'extrem 3', que absorbeix la fluorescència alliberada pel donador. Perquè això tingui lloc, *reporter* i *quencher* han d'estar espacialment pròxims. Quan la sonda està intacta, la fluorescència emesa pel donador és absorbida per l'acceptor, però durant l'amplificació del cDNA diana, la sonda s'hibrida a la seva cadena complementària. Al desplaçar-se al llarg de la seva cadena, en la seva acció de síntesi, la DNA polimerasa (que també té activitat 5'exonucleasa) hidrolitza l'extrem lliure 5' de la sonda, produint l'alliberació del fluorocrom donador. Com que donador i acceptor estan espacialment allunyats, la fluorescència emesa pel primer es captada pel lector (Figura 18A).

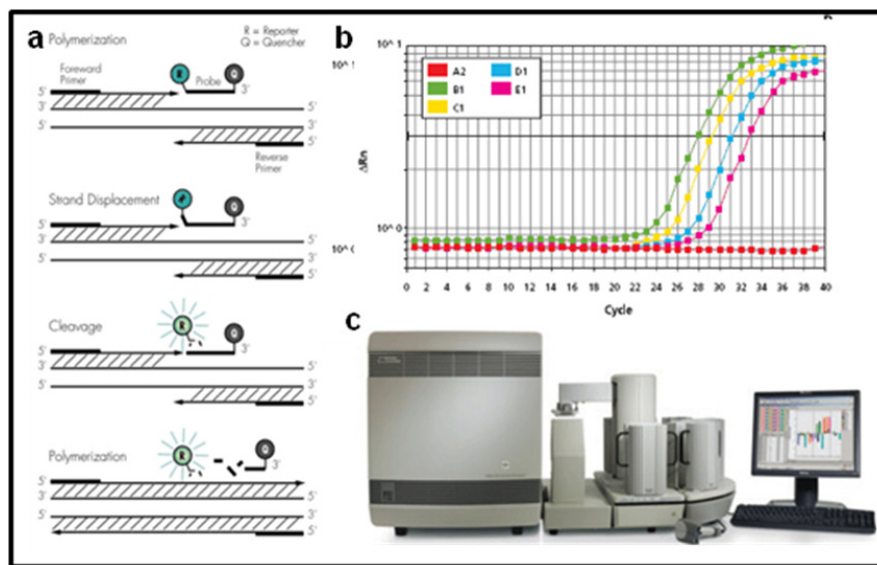


Figura 18. A) Representació esquemàtica del funcionament de la qPCR. B) Gràfica d'amplificació per PCR a temps real a escala logarítmica de 5 mostres amb dilucions seriades de la quantitat inicial de cDNA. C) Instrument 7900HT Fast Real Time PCR System d'Applied Biosystems

Per quantificar la concentració inicial de cDNA diana s'afegeixen controls externs i es realitza una **corba patró** (o estàndard) amb concentracions conegudes i creixents. El programa informàtic va enregistrant l'augment de fluorescència (proporcional a l'augment de DNA) a cada cicle. Aquesta informació es reflexa gràficament en corbes de cinètica de la reacció per cadascuna de les mostres (Figura 18B). El cicle en que es comença a detectar augment de fluorescència s'anomena **cicle llindar** (C_t , de *threshold cycle*) i és inversament proporcional a la concentració de cDNA diana present a la mostra. Interpolant les C_t de cada mostra a la corba patró, podem conèixer la concentració de DNA inicial.

Gens de referència: L'elecció del gen endogen anirà en funció de l'experiment a realitzar però la localització d'aquest hauria de ser autosòmica i estable. Els més utilitzats inclouen β -actina, gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa, hipoxantina guanina fosforibosil-transferasa i 18S del RNA ribosomal (Hugget *et al.*, 2008). Existeixen *softwares* que realitzen anàlisi d'idoneïtat de gens de referència, com per exemple el *Bestkeeper*.

Quantificació: La quantificació pot ser absoluta o relativa. La primera determina el número exacte de còpies de DNA present a cadascuna de les mostres d'interès, normalment relacionant la senyal de la PCR amb la corba estàndard. La quantificació relativa descriu els canvis en l'expressió gènica del gen problema relatiu a un grup de referència. En els nostres treballs s'utilitza el **mètode de quantificació relativa**, que va ser descrit en els seus inicis per KJ. Livak i posteriorment definit matemàticament per Livak (1997) i Schmittgen (2001) i que només és aplicable per una estimació ràpida de la proporció relativa de l'expressió gènica. Breument aquest mètode és similar al de la corba estàndard, excepte que utilitza una fórmula aritmètica per obtenir la quantificació. La fórmula utilitzada per obtenir la quantitat de cDNA de la mostra problema, normalitzada a una referència i relativa a un calibrador és:

$$\text{Quantitat de mostra} = 2^{-[\Delta\Delta Ct]}$$

On, Ct és el número del cicle llindar y $\Delta\Delta Ct = [Ct_{\text{mostra problema}} (\text{desconeguda}) - Ct_{\text{referència}} (\text{desconeguda})] - [Ct_{\text{mostra problema}} (\text{calibrador}) - Ct_{\text{referència}} (\text{calibrador})]$.

3.1.2.1 *Stem-loop* RT-qPCR

Els nivells d'expressió dels miRs varien molt entre les espècies i teixits, degut a això i a la mida d'aquests, alguns escapen de la detecció mitjançant tècniques rutinàries convencionals, per aquest motiu és convenient aplicar la *stem-loop* RT-PCR per a la seva quantificació. És una tècnica basada en la qPCR que utilitza cebadors que permeten amplificar cada miRNA mitjançant *primers* específics en *stem-loop*, permetent augmentar l'eficiència i l'especificitat. Aquesta consta de dues etapes:

1.- Síntesi de cDNA de cada miRNA utilitzant *primers* específics que porten una seqüència complementària a ells mateixos. D'aquesta manera adopten una forma de *loop* en el seu extrem 5'.

2.- Quantificació per qPCR gràcies a l'allargament de la cadena produït pel desplegament del *primer* en *stem-loop*, que posteriorment permet la unió de dos *primers* nous i una sonda necessaris per a la quantificació (Figura 19).

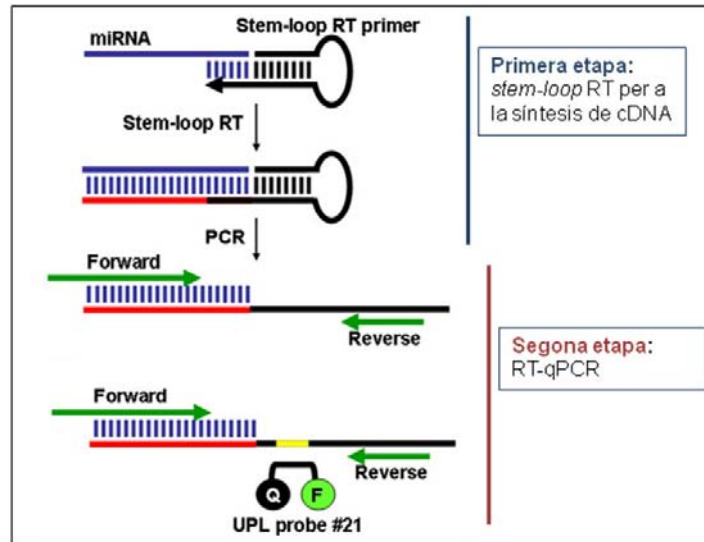


Figura 19. Etapes del procés d'amplificació i quantificació dels microRNAs.

3.1.2.2 BioMark™ System (Fluidigm®)

Es tracta del sistema més actual de qPCR, desenvolupat per Fluidigm® que ofereix una major reproductibilitat, major fiabilitat i un disseny més compacte de l'experiment al basar-se en tecnologia nanofluídica. Aquest sistema parteix d'un volum de mostra molt petit que es reparteix en 48 o 96 pous, permetent analitzar 48 o 96 dianes simultàniament sempre i quan l'RNA a testar tingui un mínim de 500 i 1000 còpies del gen. Degut a que es treballa amb microvolums i que es fan dilucions, alguns gens quedaran a molt baixa expressió, per això és recomanable fer un **STA** (de l'anglès *Specific Target Amplification*) per incrementar la concentració del material de partida (Figura 20).

Hem utilitzat aquesta tècnica per a la validació dels resultats obtinguts en els arrays d'expressió gènica.

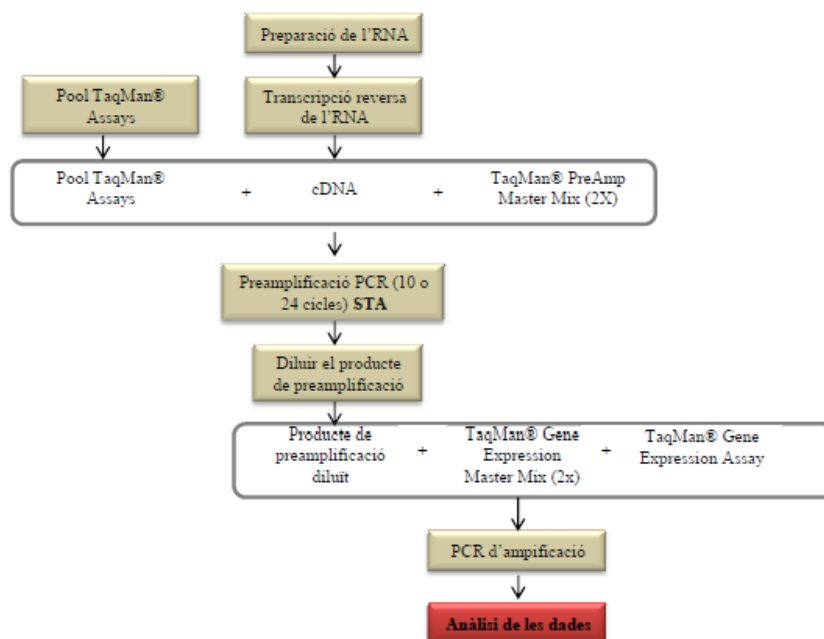


Figura 20. Esquema del procediment per a la realització del BioMark™ System (Fluidigm®). Començant per un procés de transcripció inversa de l'RNA, seguit d'una pre-amplificació amb totes les sondes dels gens, fins a l'etapa final d'amplificació de l'RNA.

3.2 TÈCNIQUES D'ANÀLISI MASSIU

El desenvolupament de tecnologies d'alt rendiment basades en el coneixement del genoma humà ha obert la possibilitat de buscar alteracions genòmiques globals en tumors, responsables del seu desenvolupament i progressió, així com la identificació de gens i vies diana d'aquestes alteracions.

3.2.1 Hibridació genòmica comparada (CGH)

És una tècnica de citogenètica molecular utilitzada per detectar desequilibris cromosòmics (guanys i pèrdues). Es basa en la hibridació *in situ* del DNA tumoral i del DNA control marcats amb fluorocroms de diferents colors sobre metafases normals. Després de la hibridació, les variacions numèriques del DNA tumoral es quantifiquen mitjançant el coeficient d'intensitat de fluorescència entre el DNA tumoral i normal. La CGH té particular interès en l'anàlisi de canvis numèrics de seqüències de DNA de tumors sòlids i en neoplàsies limfoides, però també és útil per aquells casos que presenten cariotips complexos i regions de tinció homogènia. Aquesta tècnica

únicament detecta canvis presents en una proporció elevada de cèl·lules tumorals (30-35%) i no permet la detecció de translocacions, inversions ni altres alteracions equilibrades que no comporten guanys o pèrdues de material genètic. L'avantatge d'aquesta tècnica és que només requereix DNA tumoral i no es necessari tenir metafases, que són de difícil obtenció en molts limfomes.

3.2.2 Arrays de còpia gènica (SNP 6.0 Affymetrix)

Aquesta tècnica ens permet la detecció d'alteracions cromosòmiques (guanys i pèrdues) i pèrdua d'heterozigocitat (LOH, de l'anglès *loss of heterozygosity*) o disomies uniparentals (UPD, de l'anglès *uniparental disomy*) a partir d'una mostra de DNA. La plataforma utilitzada en aquesta tesi és la d'**Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0** que conté més de 906.000 SNPs i més de 946.000 sondes per a la detecció de la variació de la dosi gènica (CNA, de l'anglès *Copy Number Alteration*).

Es requereixen entre 100-500ng de DNA de bona qualitat (amb ràtios: 260/280~1.8 i 260/230~2.0), que es digereix amb els enzims de restricció NSPI i Styl i es lliga a *primers* determinats. Posteriorment a la lligació i la PCR, el DNA es fragmenta, es marca amb sondes i s'hibrida amb l'array. Per a l'escanejat de l'array s'utilitza el Gene Chip Scanner 3000 i la imatge generada s'analitza amb el *software* d'Affymetrix GeneChip Command Console. Per a l'anàlisi de les dades s'utilitza el Genotyping Console 4. És recomanable utilitzar uns índex com a controls de qualitat, en aquest cas s'utilitza el CQC (de l'anglès *Contrast Quality Control*) > 0.4 i un valor de MAPD (de l'anglès *Median of Absolute Values of all Pairwise Differences*) < 0.35 . L'algoritme CN5 de l'Affymetrix Genotyping Console és utilitzat amb les referències de mostres normals obtingudes de la base de dades pública HapMap Sample Data Set, que inclou 270 mostres.

Existeixen altres *softwares* comercials com el Chromosome Analysis Suite (ChAS), dCHIP-SNP, el Partek Suite, el Biodiscovery i el Nexus que també permeten l'anàlisi dels resultats. Per a realitzar totes les comparacions i correlacions estadístiques s'utilitzarà principalment, l'SPSS i el software R.

3.2.3 Arrays d'expressió gènica

La base de la tecnologia dels microarrays o chips de DNA és l'automatització i robotització de les tècniques clàssiques de biologia molecular *Southern* i *Northern blot*, sent el fonament de la tècnica d'hibridació d'àcids nucleïcs. El principal avantatge respecte a les tècniques clàssiques, és la possibilitat d'immobilitzar en la superfície del microarray (plàstic, vidre, sílice) milers de sondes de DNA, permetent l'anàlisi de la presència/absència o de l'expressió de milers de gens en un sol experiment, de manera que ens permeten fer anàlisis genòmics massius.

Tipus:

Existeixen diferents tipus de microarrays en funció de la naturalesa de la sonda: els microarrays de cDNA i els microarrays d'oligonucleòtids, essent aquests últims els utilitzats en aquesta tesi, concretament l'array d'**Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 GeneChip Expression Array**. En aquest cas, s'utilitzen sondes d'oligonucleòtids (també conegudes com a *probesets*) d'una longitud de 25 nucleòtids que interroguen l'extrem 3' dels transcrits i que són sintetitzades directament a la superfície de vidre de l'array. Cada sonda va acompanyada d'un control negatiu que es la mateixa seqüència amb un canvi de base en la posició 13 de la sonda, d'aquesta manera es poden detectar i eliminar les hibridacions inespecífiques. Per tal d'augmentar l'eficiència, cada transcrit és interrogat per 11 parells de sondes. Prèviament a la hibridació, les mostres a analitzar són marcades amb biotina per poder generar posteriorment una imatge. En la tecnologia GeneChip s'hibrida una sola mostra per chip, de manera que la comparació de perfils d'expressió es realitza per cada gen en cada chip. Les avantatges d'aquest tipus de microarrays són que permeten analitzar 54675 *probesets* i seqüències gèniques expressades (EST, de l'anglès *Expressed Sequence Tag*) en un sol assaig i que presenten elevada especificitat.

Control de qualitat de les dades

Per evitar possibles falsos positius o negatius és important que les mostres passin algun control de qualitat previ a la hibridació. En primer lloc, la qualitat de l'RNA s'analitza amb el 2100 Agilent Bioanalyzer. La imatge obtinguda ha de mostrar dos pics corresponents als RNAs ribosomals 18S i 28S, l'àrea dels quals ha de ser superior al 35% i amb un RIN>8 (de l'anglès *RNA Integrity Number*). L'algorisme del RIN permet la classificació de les mostres en base a un sistema numèric de l'1 al 10, sent 1 el valor

per una mostra totalment degradada i 10 totalment intacta i s'utilitza per estandarditzar el procés d'interpretació de la integritat i eliminar el biaix associat a la interpretació visual. Aquest permet comparar quantitativament la integritat de totes les mostres de RNA d'un experiment, que haurien de tenir una qualitat similar i analitzar el grau de contaminació amb DNA genòmic. En passos posteriors el cRNA ha de tenir una mida mitja de 1000-1500 pb i com a resultat del procés de fragmentació s'han d'obtenir fragments d'entre 25-200 pb.

Posteriorment a la hibridació, i amb les dades crues s'han de tenir en compte alguns controls com:

- *Scale factor*: s'utilitza per ajustar totes les intensitats de senyal a un valor donat per l'usuari, basat amb la intensitat mitja de l'array.
- *Background*: existeix una quantitat d'hibridació no específica que afecta a la sensibilitat i especificitat del chip i que ha de ser eliminada per minimitzar efectes sobre la senyal.
- Percentatge de "presents": el número de sondes presents respecte el total ha de ser similar entre els arrays a comparar, sempre >25%. La variabilitat en aquest paràmetre representa la variabilitat biològica entre mostres.
- Controls interns AFFX-r2-Ec-BioB, BioC i BioD (*spike controls*). Són gens d'*E.Coli*, que permeten avaluar l'eficiència d'hibridació de l'assaig. BioB i BioC sempre han d'estar presents, en canvi BioD ha d'estar present com a mínim en el 75% de les mostres.
- Ratio 3'-5' GAPDH i beta-actina: s'utilitzen per controlar la degradació de l'RNA i no ha de ser superior a 3, quan més pròxim a 1 més integritat presenta la mostra.

Normalització de les dades

Amb el GeneArray® Scanner es llegeixen els valors de luminescència per cada mostra hibridada, però prèviament a la comparació, els valors s'han de normalitzar amb l'objectiu de minimitzar les variacions de senyal detectada, l'origen del qual no és biològic, sinó tècnic o instrumental. Aquesta normalització pot fer-se amb diferents algoritmes informàtics: MAS5 (*Microarray Suite 5*, Affymetrix), RMA (*Robust Multiarray Average*, GNU Project), GC-RMA, PLIER (*Probe Logarithmic Intensity Error*, Affymetrix), entre d'altres. En els nostres estudis es va utilitzar el MAS5 i l'RMA que només té en compte els PM (*Perfect Match*) i utilitza tots els chips per igual, és a dir, no utilitza cap chip com a referència.

Anàlisi bioinformàtic i estadístic

Existeixen nombrosos tests estadístics per avaluar la significança de les possibles diferències trobades. Sovint s'usen simplement criteris de filtrat de les dades basats en la variació del nivell d'expressió, és a dir, una assignació arbitrària d'un llindar respecte a la diferència d'expressió. No obstant, és més apropiat utilitzar altres tipus d'aproximacions que permetin trobar diferències biològicament significatives de les mostres d'estudi i les diferències purament degudes a l'atzar.

Es poden utilitzar tests paramètrics o no paramètrics (t-test), anàlisis de variància (ANOVA) on es dona un P valor associat al contrast, el qual representa la probabilitat de que aquestes diferències siguin degudes a l'atzar. També s'utilitza l'algoritme SAM (*Significance Analysis of Microarrays*) desenvolupat per Tusher, Tibshirani i Chu al 2001, basat en el t-test. Aquest calcula un estadístic (d_j) per cada gen (j) que mesura la força de relació entre l'expressió gènica i la una variable concreta. El mètode utilitza la repetició de permutacions per determinar si algun gen esta significativament relacionat amb la variable. El FDR (*False Discovery Rate*) s'ha d'incloure en estudis amb espais mostrals amplis ja que permet la correcció de comparacions múltiples i evita la identificació de falsos positius.

Tot i que els mètodes estadístics són més robusts i més fiables, també s'utilitzen mètodes de *clustering* per agrupar dades provinents de microarrays. Dins d'aquests trobem:

- *Clustering* no supervisat: on les dades s'agrupen sense tenir en compte cap altre tipus d'informació. Es poden utilitzar diversos algoritmes, per exemple jeràrquic i no jeràrquic (basats en una matriu de distàncies i la construcció de dendrogrames), PCA (*Principal Component Analysis*) i Gene Shaving, entre d'altres.
- *Clustering* supervisat: es basa amb la idea de que en la majoria de mostres biològiques es disposa d'informació preliminar que pot utilitzar-se per l'agrupació de les dades en els anomenats clústers. Amb aquesta estratègia s'intenta descobrir nous criteris que ajudin a classificar correctament les mostres addicionals de tipus desconegut a la categoria corresponent.

Hi ha programes específics com el ComBat (*Combating batch effects*) que utilitza mètodes paramètrics i no paramètrics per eliminar variacions no biològiques o l'efecte conegut com **efecte batch**.

En el nostre cas, l'anàlisi dels resultats s'ha dut a terme mitjançant diferents

plataformes: DChip, Gene Expression Console, Bioconductor, ComBat, BrB tools.

Validació dels resultats

És una etapa imprescindible quan es treballa amb dades de genòmica i concretament obtingudes del processament de microarrays. S'utilitzen altres tècniques per tal de confirmar la robustesa de les conclusions obtingudes en l'anàlisi principal, com per exemple qPCR i/o tècniques de *Nouthern Blot*, a nivell d'RNA i immunohistoquímica i/o *Western Blot* a nivell de proteïna. Generalment s'utilitza una sèrie mostral independent a la interrogada en el primer anàlisi.

Associació entre gens diferencialment expressats i vies implicades

Actualment es disposa de diferents plataformes d'anàlisi de microarrays que inclouen algoritmes que permeten identificar vies cel·lulars i mecanismes moleculars en què estan implicats algun conjunt de gens que ha resultat significatiu, així com altra informació funcional (rutes metabòliques, motius, factors de transcripció...). Per això s'utilitzen diferents bases de dades que associen gens amb l'entorn cel·lular a través de les vies de senyalització (*pathways*). Les bases de dades de rutes biològiques més utilitzades són: *Gene Ontology* (GO), *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) i Biocarta.

Existeixen diferents programes que permeten fer aquesta aproximació, els utilitzats en aquesta tesi són: GOrilla (*Gene Ontology enRIchment anaLysis and visuaLization tool*), GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*), DAVID (*Database for Anotation, Visualization and Integrated Discovery*) i IPA (*Ingenuity systems Pathway Analysis*).

3.3 ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ PROTEICA

3.3.1 Immunohistoquímica (IHQ)

Durant les últimes dècades la utilització de la IHQ ha anat creixent progressivament i s'ha consolidat com a tecnologia essencial en el diagnòstic patològic de rutina, especialment en patologia oncològica. La incorporació de nous protocols i l'afluència de nous anticossos està ampliant notablement l'àmbit d'aplicació amb noves utilitats en el diagnòstic i el pronòstic. És una tècnica que permet detectar una ampla varietat d'antígens presents a les cèl·lules o teixits utilitzant anticossos marcats amb alguna altra

substància que absorbeix o emet llum (immunofluorescència) o bé que produeix coloració. De manera que dona informació sobre la presència i localització d'una proteïna, però no de la dimensió i la quantitat d'aquesta. Pot aplicar-se sobre una mostra de teixit orgànic, correctament fixada i inclosa en parafina.

En aquesta tesi només s'ha aplicat aquesta tècnica utilitzant anticossos unts a enzims capaços de fer canviar de color un substrat incolor. La peroxidasa, la fosfatasa alcalina i els substrats de diaminobenzidina són alguns dels enzims més freqüentment usats, aquests poden conjuguar-se directament a l'anticòs primari o bé requereixen de l'ús d'un anticòs secundari d'altres substàncies com la biotina (marcatge indirecte) (Figura 21).

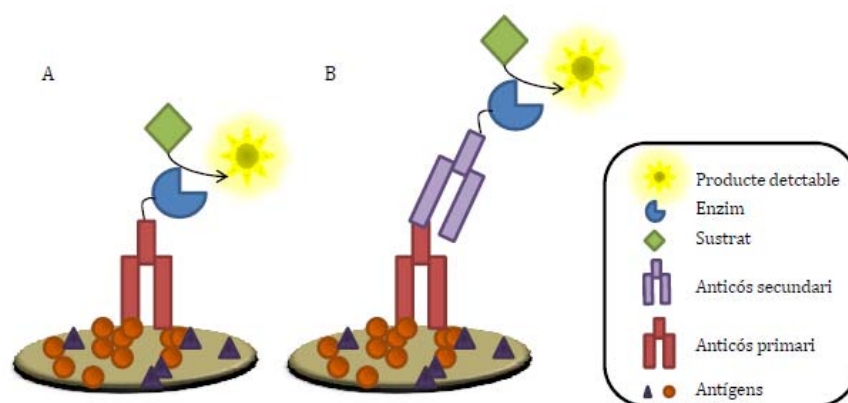


Figura 21. Exemple d'immunohistoquímica utilitzant sistemes de peroxidasa mitjançant marcatge indirecte. A) sense l'ús d'anticòs secundari i B) amb anticòs secundari.

És important tenir en compte el mètode de fixació de la mostra per preservar la morfologia i la composició química de les cèl·lules i els teixits, així com la dilució de l'anticòs a la que es treballa. En el nostre cas s'ha usat immunohistoquímica de marcatge directe per a la detecció de les proteïnes especificades a la Taula 5.

Anticòs	Casa comercial	Clona
SOX11	Atlas Antibodies	HPA000536
p53	Dako	Do-7
Ki67	Dako	Mib-1
Ciclina D1	Dako	SP4 i EP12
CD10	Dako	56C6
CD5	Dako	4C7
CD23	Dako	SP23

Taula 5. Anticossos utilitzats per la detecció de proteïnes mitjançant IHQ.

3.4 ANÀLISI CEL·LULAR

3.4.1 Citometria de flux

És una tècnica senzilla que s'aplica a la rutina diària de molts laboratoris clínics i d'investigació, capaç de proporcionar resultats de manera ràpida que poden ser aplicables al diagnòstic. Gràcies a la seva gran especificitat, és capaç de detectar una població cel·lular en una mostra en la que predominen altres poblacions cel·lulars majoritàries. La principal característica és que pot oferir informació simultània de diversos paràmetres de cadascuna de les cèl·lules analitzades. El principal inconvenient de la tècnica és que s'ha d'utilitzar una suspensió de partícules (generalment cèl·lules) alineades que passen per davant d'un làser focalitzat d'una en una, de manera que es perd la informació sobre l'arquitectura dels teixits així com la interacció d'aquests amb el medi. No obstant, presenta molts avantatges, com ara, la possibilitat de marcatge múltiple, la possibilitat d'analitzar un elevat número de partícules en un període curt de temps (5000 partícules/segon), major sensibilitat i possibilitat de detecció de malaltia mínima residual, així com la possibilitat de quantificació. Es requereix d'un citòmetre, que està format per un sistema fluídric, que és l'encarregat de la injecció de la mostra, un sistema òptic per emetre i captar les diferents longituds d'ona, i un sistema elèctric que ho converteix tot en senyals digitals que s'emmagatzemen a l'ordinador. L'impacte de cada cèl·lula amb el raig de llum produeix senyals que corresponen a paràmetres de la cèl·lula i que són recollits per diferents detectors. S'obté informació sobre morfologia (mida i complexitat), característiques antigèniques (immunofenotip) i paràmetres físics (mida relativa i complexitat interna).

En els nostres treballs s'utilitza aquesta tècnica per avaluar la composició de les mostres de sang rebudes, així com la puresa de les fraccions obtingudes després de la selecció de les poblacions d'interès, com els limfòcits B tumorals (Figura 22).

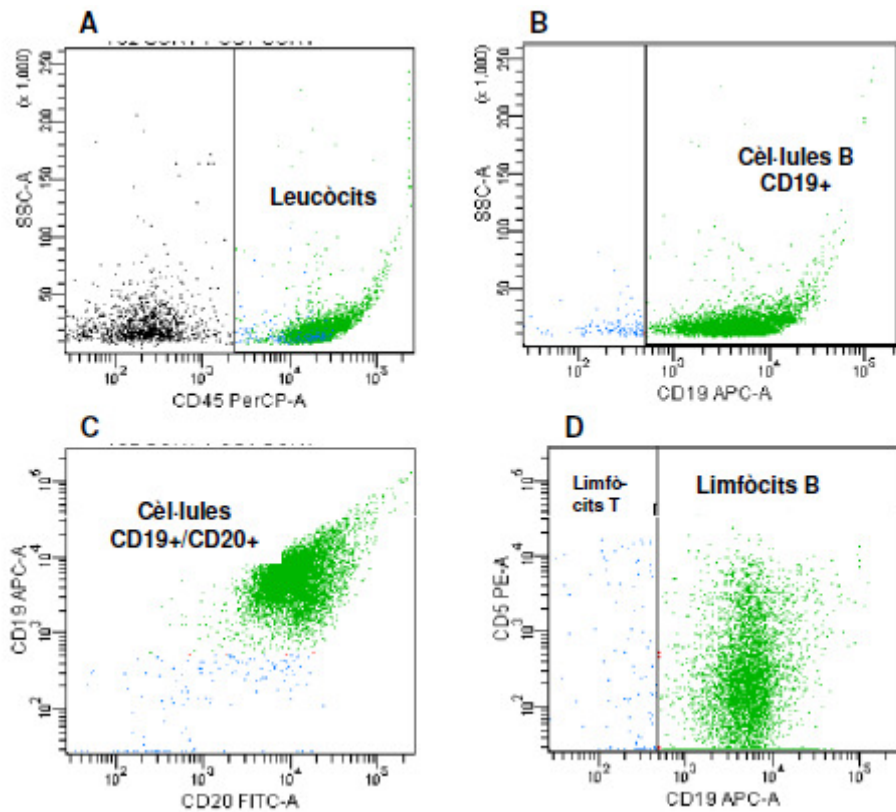


Figura 22. Imatge obtinguda després de passar una mostra tumoral pel citòmetre. A) Marcatge amb CD45 que ens permet veure la fracció leucocitària; B i C) Poblacions de cèl·lules B CD19+ i CD20+ purificades; D) Separació entre limfòcits B tumorals CD5+ i CD19+ i T CD5+ i CD19-.

4. RESULTATS

**ARTICLE 1: L'estat mutacional dels gens de les immunoglobulines
identifica un subgrup de pacients amb limfoma de cèl·lules del mantell
amb característiques clíniques i biològiques específiques.**

Acceptat a CANCER RESEARCH. Agost del 2012

Resum:

El limfoma de cèl·lules del mantell (LCM) és un limfoma molt heterogeni, molts pacients segueixen un curs clínic agressiu mentre que d'altres presenten un curs indolent. Vam realitzar un anàlisi integratiu i multidisciplinar dels gens IGHV en 177 pacients de LCM per determinar les característiques immunogenètiques d'aquests receptors i poder identificar diferents subgrups d'aquests tumors. Els gens IGHV no mutats (TU de l'anglès *truly unmutated*; 100% d'identitat) es van trobar en un 24% dels casos, el 40% eren mínimament mutats (MBM de l'anglès *minimally/borderline mutated*; 99.9-97%), el 19% eren significativament mutats (SM de l'anglès *significantly mutated*; 96.9-95%) i el 17% hipermutats (HM de l'anglès *hypermuted*; <95%). Els tumors amb elevada (>97%) i baixa (<97%) càrrega mutacional usaven preferencialment determinats gens IGHV i el perfil d'expressió gènica també mostrava programes cel·lulars diferencialment expressats. Els tumors HM/SM mostraven menys complexitat genòmica, eren més freqüentment *SOX11* negatius, i els pacients presentaven afectació ganglionar amb més freqüència. El millor punt de tall de les mutacions somàtiques per predir supervivència va ser del 3%. Pacients amb alta o baixa càrrega mutacional presentaven diferències significatives en relació al pronòstic amb una supervivència mitja de 62.5 i 40.9 mesos, respectivament (P=0.004). La presentació ganglionar i l'expressió de *SOX11* també semblaven ser predictors de la supervivència global. En un anàlisi multivariant, l'estat de dels gens IGHV i *SOX11*, però no la presentació ganglionar, eren factors de risc independents. En conclusió, les observacions donen suport a la idea de que els LCM amb IG mutades, *SOX11* negatius i sense afectació ganglionar corresponen a un subtipus de la malaltia amb un comportament clínic indolent.

Molecular subsets of mantle cell lymphoma defined by the *IGHV* mutational status and SOX11 expression have distinct biological and clinical features

Alba Navarro,¹ Guillem Clot,¹ Cristina Royo,¹ Pedro Jares,¹ Anastasia Hadzidimitriou,² Andreas Agathangelidis,²⁻³ Vasilis Bikos,² Nikos Darzentas,² Theodora Papadaki,⁴ Itziar Salaverria,^{1,5} Magda Pinyol,¹ Xavier Puig,⁶ Jara Palomero,¹ Maria Carmela Vegliante,¹ Virginia Amador,¹ Alejandra Martinez-Trillos,¹ Lenka Stefancikova,⁷ Adrian Wiestner,⁸ Wyndham Wilson,⁸ Christiane Pott,⁹ Maria Jose Calasanz,¹⁰ Nicola Trim,¹¹ Wendy Erber,¹² Birgitta Sander,¹³ German Ott,¹⁴ Andreas Rosenwald,¹⁵ Dolors Colomer,¹ Eva Giné,¹ Reiner Siebert,⁵ Armando Lopez-Guillermo,¹ Kostas Stamatopoulos,^{2,16} Sílvia Beà¹, Elías Campo¹

Authors' Affiliations: ¹Pathology and Hematology Departments, Hospital Clínic, University of Barcelona, Institute of Biomedical Research August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain; ²Institute of Agrobiotechnology, Center for Research and Technology Hellas, Thessaloniki, Greece; ³School of Biology, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece; ⁴Evangelismos Hospital, Athens, Greece; ⁵Institute of Human Genetics, University Kiel, Kiel, Germany; ⁶Department of Statistics, Technical University of Catalonia, Barcelona, Spain; ⁷Department of Experimental Biology, Faculty of Sciences, Masaryk University, Brno, Czech Republic; ⁸Hematology Branch, National Heart, Lung, and Blood Institute, Bethesda, MD, USA; ⁹Department of Medicine, University Medical Center Schleswig-Holstein, Kiel, Germany; ¹⁰Department of Genetics, University of Navarra, Pamplona, Spain; ¹¹Addenbrooke's Hospital, Cambridge, UK; ¹²School of Pathology and Laboratory Medicine, The University of Western Australia, Nedlands, Australia; ¹³Division of Pathology, Department of Laboratory Medicine, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden; ¹⁴Department of Clinical Pathology, Robert-Bosch-Krankenhaus and Dr.Margarete Fischer-Bosch Institute of Clinical Pharmacology, Stuttgart, Germany; ¹⁵University of Würzburg, Würzburg, Germany; ¹⁶Hematology Department and HCT Unit, G. Papanicolaou Hospital, Thessaloniki, Greece.

S.Beà and E.Campo contributed equally.

Corresponding Authors:

Sílvia Beà and Elías Campo, Hospital Clínic, Villarroel 170, 08036-Barcelona, Spain; Ph +34-93-2275450; Fax +34-93-2275717; E-mails: sbea@clinic.ub.es and ecampo@clinic.ub.es.

Conflict of interests: no conflicts of interest to be disclosed.

Running title: *IGHV* GENES IN MCL

Keywords: mantle cell lymphoma, immunoglobulin rearrangement, SOX11, expression profiling, prognosis.

Word count: 4911

Number of Figures and Tables: 7

Grant Support: Spanish Ministry of Science SAF 2008-03630 (E.C.), “Instituto de Salud Carlos III, Fondo Investigaciones Sanitarias” (PI08/0077 and PI11/01177) (S.B.), “Red Temática de Investigación Cooperativa de Cáncer” RD06/0020/0039, (RD06/0020/0014, RD06/0020/0051, “Formación de Personal Investigador” (BES-2007-16330) (A.N.), Fondo Europeo de Desarrollo Regional. Unión Europea. “Una manera de hacer Europa”, European Mantle Cell Lymphoma Network, Generalitat de Catalunya (2009-SGR-992; 2009-SGR-967), European Science Foundation, 'Frontiers of Functional Genomics' (L.S.), Cariplo Foundation and Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro (Italy), ENosAI project (09SYN-13-880), co-funded by the EU and the Hellenic General Secretariat for Research and Technology.

Abstract

Mantle cell lymphoma (MCL) is a heterogeneous disease with most patients following an aggressive clinical course while others have an indolent behavior. We performed an integrative and multidisciplinary analysis of 177 MCL to determine whether the immunogenetic features of the clonotypic B cell receptors may identify different subsets of tumors. ‘Truly unmutated’ (100% identity) *IGHV* genes were found in 24% cases, 40% were ‘minimally/borderline mutated’ (99.9-97%), 19% ‘significantly mutated’ (96.9-95%) and 17% ‘hypermutated’ (<95%). Tumors with high ($\geq 97\%$) or low (<97%) mutational load used different *IGHV* genes and their gene expression profiles were also different for several gene pathways. A gene set enrichment analysis showed that MCL with high and low *IGHV* mutations were enriched in memory and naïve B-cell signatures, respectively. Furthermore, the highly mutated tumors displayed less genomic complexity, were preferentially *SOX11* negative, and showed more frequently non-nodal disease. The best cut-off of germline identity of *IGHV* genes to predict survival was 3%. Patients with high and low mutational load had significant different outcome with 5-year overall survival of 59% and 40%, respectively ($P=0.004$). Nodal presentation and *SOX11* expression also predicted for poor overall survival. In a multivariate analysis, *IGHV* gene status and *SOX11* expression were independent risk factors. In conclusion, these observations suggest the idea that MCL with mutated *IGHV*, *SOX11* negativity, and non-nodal presentation correspond to a subtype of the disease with more indolent behavior.

Introduction

Mantle cell lymphoma (MCL) is a mature B-cell neoplasm clinically characterized by a generalized lymphadenopathy, disseminated disease at diagnosis and a poor clinical evolution (1). The translocation t(11;14)(q13;q32) deregulating cyclin D1 expression is considered the primary oncogenic event (2,3). Additionally, MCL usually carry a high number of secondary chromosomal alterations targeting different oncogenic pathways that contribute to the progression of the disease (4-8).

The immunogenetic analysis of the clonogenic B cell receptors (BcRs) in B-cell neoplasms has made significant contributions towards understanding their ontogenetic derivation, obtaining evidence for the possible involvement of antigen selection in their pathogenesis, and identifying biological subtypes with clinical implications (9-12). These studies have also proven to be of clinical relevance as exemplified by chronic lymphocytic leukemia (CLL), where molecular analysis of the immunoglobulin (IG) genes expressed by the clonogenic BcRs identifies subsets of tumors with different biological features, clinical presentation and outcome, indicating that the functional antigen reactivity of the clonogenic BcRs is critically implicated in shaping the biological behavior of the malignant clones (9,10,13-16).

MCL shares certain phenotypic and biological analogies with CLL (1). Several studies have shown that 15-40% of MCL have a somatically hypermutated BcR and a strong restriction in *IGHV* gene usage (17,18). Similar to CLL (19), closely homologous (stereotyped) VH CDR3s have been recognized in MCL, albeit with molecular features clearly distinct from those described in CLL (17,19). Altogether, these immunogenetic findings strongly argue for antigen-driven selection in the clonogenic expansion of tumor cells in MCL (17). However, contrary to CLL, the clinical implications of immunogenetic analysis in MCL remain controversial (18,20-26). Most studies have found no relationship between the mutational status of the clonogenic *IGHV* genes and the evolution of the disease (23,27). Although a tendency to longer survival has been reported for patients with a high number of somatic mutations or carrying specific *IGHV* genes (18,21,22,28). Moreover, a subset of patients with a very indolent clinical course and SOX11 negative expression seem to express IGs with a high load of somatic hypermutation (SHM) (20). A potential confounding issue in most relevant studies has been the application of a 2% identity cut-off value for assigning cases to the mutated or unmutated subgroup. This cut-off has been utilized widely for prognostication in CLL but may not be appropriate outside this context. In particular, it may mask the biological

(and, perhaps, clinical) heterogeneity of MCL as also indicated by the recent finding that subsets of MCL cases with different mutational load display marked immunogenetic differences, even when comparing cases with limited mutations (98-99.9% identity) to those with no mutations at all (100% identity) (17). In the present study, we performed an integrative and multidisciplinary analysis of a large series of MCL in order to determine whether the specific molecular features of the clonotypic BcR may identify subsets of tumors with biological differences potentially underlying a different clinical behavior.

Materials and Methods

Study population. 177 patients with MCL were selected based on the availability of tumor samples. All cases had the t(11;14)(q13;q32) and/or cyclin D1 overexpression. Samples were obtained from peripheral blood (n=99), lymph nodes (n=41), spleen (n=15), bone marrow (n=7), and other tissues (n=15). The *IGHV* gene mutational status of 41 out of 177 cases was reported previously (17). Clinical information is summarized in Table 1. The patients were managed heterogeneously: thirteen patients did not receive chemotherapy and fifteen patients received front-line intensive treatment with high-dose araC and/or autologous stem cell transplant. Ninety patients were treated with different regimens of conventional chemotherapy. Rituximab was administered to 43 patients at some stage during the course of their disease. Tissue sections for evaluation of the histological variants and additional pathological features were available in 95 cases (Table 1). The study was approved by the Institutional Review Board and informed consent was obtained from each patient.

Amplification of *IGHV-IGHD-IGHJ* rearrangements, sequence analysis and interpretation. PCR amplification was performed using either complementary or genomic DNA extracted from cryopreserved blood cells, frozen tissues and formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) tissues (17 cases). RNA and DNA were extracted by using the TRIZOL reagent (Invitrogen Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD), QIAamp DNA mini-kit, AllPrep DNA/RNA Mini Kit (for tissue samples), and FFPE RNeasy minikit (for FFPE tissues)(QIAGEN, Germantown, MA, USA).

IGHV-IGHD-IGHJ rearrangements were amplified and analyzed as reported previously (10,29). The sequences were analyzed using IMGT® databases and tools (30,31) (32). Only productive rearrangements were evaluated. Output data from IMGT/V-QUEST was used to obtain: *IGHV* gene usage, percentage of identity to germ line, length and composition of the VH CDR3.

Gene expression profiling. We studied the gene expression profiling (GEP) of 38 cases using highly purified leukemic cells (>95% by flow cytometry) from untreated MCL patients. RNA was hybridized to Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays (Affymetrix, Santa Clara, CA), as described previously (20). The analysis of the scanned images and the determination of the signal value were obtained with GeneChip® Command Console® Software (Affymetrix). Raw data were imported

to R Package. The data was normalized using the Robust Multichip Analysis algorithm of the BioConductor affy Package and the 25% of genes with lower interquartile range were excluded. Differential gene expression between the subgroups of cases was performed using moderated t-statistics with empirical Bayes shrinkage of the standard errors, implemented in the BioConductor limma Package (33). The false discovery rate (FDR) method of Benjamini and Hochberg was used to adjust the *P*-value for each gene based on a significance level of 0.05. Functional enrichment analysis of the differentially expressed genes was performed using the DAVID and IPA applications. The primary data of the microarrays are available from the Gene Expression Omnibus (GEO) of the National Center for Biotechnology Information, accession number GSE36000.

Twenty differentially expressed genes were selected and validated by quantitative PCR (qPCR) using the Fluidigm BioMark Real Time System (Fluidigm, San Francisco, CA). Total RNA was retrotranscribed to cDNA using the high capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) and pre-amplified with 14 cycles according to the manufacturer's recommendations. The *GUSB* and *B2M* genes were used as endogenous controls and Universal Human Reference RNA (Stratagene, La Jolla, CA, US) as the calibrator sample.

Gene set enrichment analysis (GSEA). We performed an enrichment pathway analysis using the GSEA desktop application (GSEA, Broad Institute at MIT, Cambridge, MA). We used a pre-ranked gene list based on the limma's statistic obtained in the differential expression analysis using the curated collection of canonical pathways (3276 gene sets). We added four additional gene sets generated in-house to capture gene expression signatures associated with different B-cell origin, using data available at the GEO (accession number GDS3516) (Supplemental Table S1). The B-cell origin signatures were defined by those genes that were more significantly expressed, exhibiting at least 20% higher levels compared to the second highest expressing group (for naïve and memory B-cell signatures) and 50% (for germinal center cell and plasma cell signatures) in order to obtain approximately 100-200 genes in each signature.

Analysis of SOX11 expression. SOX11 expression was evaluated in 161/177 (90%) cases and categorized as positive or negative according to previous defined criteria (20,29,34). One hundred forty-three cases were analyzed by qPCR using the cut-off of 9 relative units (29), 64 cases were analyzed by immunohistochemistry (34) and 50

cases by GEP using as cut-off a signal value of 120 for the probe set 204913_s_at following a MAS5 normalization with a target intensity of 150. Overall, 51% of the cases were evaluated with at least two different techniques, with fully concordant results (Supplemental Figure S1).

Molecular analysis. *TP53* mutational analysis was performed as previously described (29) and the genomic profile of 101 cases was investigated using the Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0 in 73 cases and the 100K SNP-array in 28 cases, as previously described (Affymetrix, Santa Clara, CA) (35,36).

Statistical analysis. The independence between categorical clinical parameters and the MCL subgroups was evaluated using Fisher's exact test and continuous variables were compared by Mann-Whitney or Kruskal-Wallis tests. To find the best *IGHV* gene identity % cut-off related to survival we used a maximally selected log-rank statistic (maxstat package). Overall survival (OS) was measured from date of diagnosis to date of death or last follow-up. Survival was estimated using the Kaplan-Meier method and survival curves were compared using the log-rank test. The association between different variables and outcome was estimated using univariate Cox regression analysis, whereas the independence of *IGHV* gene mutational status was estimated by multivariate Cox regression analysis. Covariates included in the multivariate were age, nodal presentation, *IGHV* gene mutational status and SOX11 expression. The variables selected for the multivariate analysis were the ones statistically significant in the univariate analysis and which had information available in more than 100 patients. The covariates used in the model did not show co-linearity and did not violate the proportional hazard assumption (by assessing the plots of smoothed martingale residuals). *P* values ≤ 0.05 were considered statistically significant. All analyses were performed with SPSS software v.18.0 (Chicago, IL) and R Package.

Results

IG gene repertoires and SHM

A total of 177 productive *IGHV-IGHD-IGHJ* rearrangements from 177 patients were analyzed. Based on the approach introduced by Hadzidimitriou *et al* (17) we subdivided the cohort in three subsets: i) ‘truly unmutated’ (TU; 100% identity), ii) ‘minimally/borderline mutated’ (MBM; 99.9-97% identity), and iii) ‘significantly mutated’ (SM; 96.9-95% identity). We included an additional subset defined as ‘hypermutated’ (HM; <95% identity). Overall, 24% of the cases were classified as TU, 40% as MBM, 19% as SM and 17% as HM *IGHV* (Table 1).

As expected, *IGHV3* and *IGHV4* were predominant (39% and 28% of cases, respectively). The *IG* repertoire is skewed, since 53% of the gene usage was represented by only six genes, *IGHV1-8* (12%), *IGHV4-34* (11%), *IGHV3-21* (9%), *IGHV3-23* (7%), *IGHV5-51* (7%), and *IGHV4-59* (6%) (Supplemental Table S2), this bias in the repertoire is similar to the previously reported in a large cohort of MCL (17). The *IGHV* gene repertoire of the four mutational subsets was different: *IGHV1-8* was preferentially used by TU cases (41%) and MBM cases (32%); *IGHV4-34* and *IGHV3-21* were more common in MBM (55 and 50%, respectively); *IGHV4-59* predominated in the HM subset (55%); and *IGHV3-23* was found with similar frequencies in the HM and MBM subsets (38%) (Figure 1 and Supplemental Table S2).

We identified twenty-four *IGHD* genes among which the *IGHD2-2* (13%), *IGHD3-3* (10%), *IGHD2-15* (8%) and *IGHD1-26* (7%) predominated (Supplementary Table S2). Interestingly, *IGHD1-26* was more frequently associated with the TU group (16%) and *IGHD2-2* was mainly found in HM and SM (17% and 24%, respectively). Most of the cases utilized *IGHJ4* (39%) and *IGHJ6* (28%) with no differences among the four *IGHV* mutational subsets (Supplemental Table S2). The median VH CDR3 length was 16 amino acids (aa) (range 7-30). *IGHV5-51* and *IGHV3-23* displaying shorter VH CDR3 compared to *IGHV3-34* and *IGHV3-21* rearrangements (11 and 13 aa vs. 18 and 19 aa, respectively). Differential patterns of *IGHV-IGHD* and *IGHV-IGHJ* associations were identified that were concordant with our previous findings (17).

Recurrent aa changes introduced by SHM in conserved positions of the VH domain are considered as suggestive of antigen selection (9,12,17,19). We found such changes in mainly in *IGHV4-59*, *IGHV3-23* and *IGHV1-8* rearrangements (Supplemental Figure S2). As an example, codon 92 (FR3) of the *IGHV4-59*

rearrangements was mutated in 55% of the cases, with the substitution S-to-T in this codon being detected in 36% of cases (Supplementary Figure S2).

MCL subsets exhibit distinct pathological and molecular features

We explored potential associations between *IGHV* gene mutational status and several features of the MCL tumors. HM-MCL was conspicuous for the complete absence of blastoid/pleomorphic variants, whereas their proportion was similar in the other subgroups ($P=0.045$) (Table 1). Only half of the HM-MCL cases expressed CD5 whereas almost all tumors of the other mutational subsets were positive ($P<0.001$) (Table 1).

SOX11 expression was positive in 69% of evaluated (Table 1). SOX11-positive tumors had significantly lower *IGHV* gene mutations than SOX11-negative tumors (mean % identity: 98.7% and 95.1%, respectively; $P<0.001$) (Figure 2A). Notably, SOX11 expression was predominantly found in tumors with no or low *IGHV* mutations (TU 86%; MBM 80%) whereas only a small number of MCL with high number of *IGHV* mutations expressed SOX11 (HM 17%; SM 36%) ($P<0.001$) (Figure 2B; Table 1).

The profile of gains and losses of 101 cases analyzed by SNP-arrays was concordant with the pattern previously defined (5). The main losses were located at 11q (35%), 8p (33%), 13q (30%), 17p (26%) and 9p (21%) whereas regions with gains were 3q (30%) and 8q (23%). The number of copy number alterations (CNA) was inversely related to the level of SHM and varied from 2.8 (range 0-26) in HM tumors to 8.6 (range 0-34) in TU MCL ($P<0.001$) (Table 1). The number of cases with high genomic complexity (≥ 4 alterations) was significantly lower in HM and SM (22% and 37%) than in MBM and TU tumors (77% and 79%) ($P<0.001$) (Figure 3, Table 1). Interestingly, no deletions of the *ATM* and *CDKN2A* were observed in HM MCL compared to the remaining three groups whereas *TP53* gene mutations and 17p alterations/*TP53* mutations were similarly distributed among the four subsets of MCL (Table 1 and Figure 3).

GEP reveals distinct signatures and putative cell of origin in MCL subsets with different IGHV gene mutational status

To identify biological features that could distinguish the different subsets of MCL according to SHM status, we performed a genome-wide GEP of 38 purified peripheral blood untreated tumor samples. We grouped the HM and SM cases as mutated MCL (M-MCL) and the MBM and TU as unmutated MCL (U-MCL) and found 518 genes differentially expressed: 395 genes were upregulated in U-MCL and 123 in M-MCL (Supplemental Table S3). The signature of 13 genes, including *SOX11*, that we found previously underexpressed in indolent MCL (20), was also downregulated in M-MCL in this independent series. The previously described GEP proliferation signature (37) and survival predictor signature (38) were not significantly different between the two subgroups, although there was a trend to lower proliferation (mean±standard deviation; 0.14 ± 0.25 vs 0.51 ± 1.04) and better prognosis score (-0.09 ± 0.41 vs 0.32 ± 1.03) in M-MCL compared to U-MCL, respectively.

To gain insights into the biological meaning of the differential expression profile between M-MCL and U-MCL, we performed a functional enrichment analysis using the DAVID application. The most significant biological processes enriched among the up-regulated genes in M-MCL were related to translational elongation, ribosome biogenesis, regulation of B-cell activation and leukocyte/lymphocyte activation. On the other hand, the regulation of transcription, apoptosis/cell death and response to extracellular stimulus were the functional terms enriched among the genes significantly upregulated in U-MCL group (Figure 4A). Very similar results were also obtained using IPA (data not shown).

To validate the GEP results we performed qPCR of 20 selected genes in 38 cases, 21 M-MCL and 17 U-MCL, six tumors studied by GEP and 32 independent cases. The results were concordant in 18/20 (90%) (Supplemental Table S4).

To investigate whether the different GEP of the U-MCL and M-MCL could be related to a particular subtype of normal B-cell counterpart we performed a GSEA using four specific gene sets related to different normal B-cell subtypes, this analysis indicated that the *SOX11*-positive U-MCL expressed a signature enriched in genes related to naïve B-cells (FDR: 0.001 and NES: 1.7) whereas *SOX11*-negative M-MCL had a signature related to memory B-cells (FDR: 0.086 and NES: 1.28) (Figure 4B).

IGHV gene mutational status defines MCL subsets with distinct clinical presentation and outcome

The male/female ratio was significantly different in the four MCL subsets, varying from 1 in HM MCL to 4.7 in TU tumors ($P=0.027$) (Table 1). The major clinical difference concerned nodal presentation, which was less common in HM (26%) and SM (50%) than in MBM (84%) and TU (80%) MCL ($P<0.001$). Blood lymphocytosis was higher in MBM- and TU-MCL but the differences were not statistically significant (Table 1).

The four MCL subsets did not differ regarding the use of different treatments, including either high dose AraC and/or autologous stem cell transplantation or Rituximab at any time during the course of the disease. Overall, 68 and 71% of HM and SM MCL were treated during the clinical course compared to 96 and 100% of MBM and TU, respectively ($P<0.001$). M-MCL patients had a significantly better OS than U-MCL patients ($P=0.023$) (Table 1 and Figure 5A). The *IGHV* gene identity cut-offs that best discriminates the patient's outcome were 96.6% and 97% (Supplementary Figure S3). For simplicity we selected the 97% cut-off and found that M-MCL had a significantly better outcome than U-MCL with 5-year OS rates of 59% and 40%, respectively ($P=0.004$) (Figure 5B).

In addition to SHM, variables predicting for poor OS on univariate analysis were advanced age, high serum LDH, nodal presentation, blastoid morphology, high Ki67 expression, positive *SOX11* expression and 17p/*TP53* alteration (Table 2). Because both, high *IGHV* gene mutational load and *SOX11*-negativity have been associated with a more indolent evolution of MCL, we examined which of the two was the most important variable for OS (Figure 5C). Interestingly, M-MCL patients negative for *SOX11* ($n=23$, 5-year OS, 73%) had a significantly better prognosis than the other subgroups of patients ($P=0.005$). In addition, 17p/*TP53* alterations in this subgroup of M-MCL recognized a subset of patients with a significant worst outcome (Figure 5D).

Finally, we performed a multivariate analysis with: age, nodal presentation, *IGHV* gene mutational status, and *SOX11* expression. In the final model with 112 cases, age (relative risk [RR]: 1.03; 95% confidence interval [CI]: 1.01-1.06; $P=0.001$), *IGHV* gene mutational status (RR: 2.01; 95% CI: 1.08-3.74; $P=0.029$), and *SOX11* expression (RR: 2.44; 95% CI: 1.22-4.9; $P=0.012$) were identified as independent risk factors for OS, whereas the nodal presentation no longer retained any prognostic value.

Discussion

The immunogenetic analysis of the BcR in B-cell neoplasms has helped to identify biological subtypes with clinical implications (9-12,12,39-42). A recent study of the *IGHV* genes in a large series of MCL provided strong molecular evidence for antigen-driven selection in the pathogenesis of at least a subset of cases and also led to the identification of distinct molecular subsets of MCL defined by the repertoire and mutational status of the clonogenic *IGs* (17). In the present study, we report that these molecular subsets exhibit distinct genetic, molecular and clinical characteristics suggesting that they may correspond to different subtypes of the disease.

The clinical relevance of the *IGHV* gene mutational status in MCL has been controversial. Almost all previous studies have discriminated subsets of MCL following the 98% *IGHV* gene germline identity cut-off established for CLL (10,41). However, as highlighted by Hadzidimitriou *et al* (17), this approach may have overlooked the particular biological characteristics of MCL. Following the *IGHV* mutational subset definition of this study, we stratified our MCL series in truly unmutated, minimally/borderline mutated and significantly mutated subsets, and included an additional group of hypermutated MCL (17).

Our series was enriched in tumors with SM and HM *IGHV* genes, similar to the study of Orchard *et al* (18) who reported 29% of cases in their cohort exhibiting <97% identity. Interestingly, this immunogenetic bias in these two cohorts likely reflects the higher frequency of the non-nodal clinical presentation (present study: 31%; Orchard *et al*: 46%) compared to most other MCL studies (17). These differences are probably due to the characteristics of the collaborative centers in our study that include reference laboratories for leukemic patients in addition to surgical pathology groups. In contrast, most previous studies of the BcR in MCL have been performed in patients from clinical trials that required histological confirmation of the tumor (22) or in tumor samples recruited from surgical pathology departments (21,23-25,43) and, therefore, may have underestimated the subset of patients presenting with leukemic non-nodal disease.

The major clinical and biological differences among patients were observed between the HM and TU-MCL, whereas SM and MBM tumors had intermediate features with a tendency to resemble the HM and TU tumors, respectively (Table 1). The most significant differences among the mutational subsets concerned *IGHV* gene usage, CD5 expression, genomic complexity, gene expression profiles, including SOX11 expression, gender distribution, and nodal presentation. All these findings support the

concept that the mutational status of the *IGHV* genes identifies biologically and clinically distinct subsets of MCL.

The relationship between *IGHV* gene mutational status and the clinical course of MCL has been addressed in different studies but the results have been inconclusive with only some tendencies to favorable outcome in tumors with high mutational load. In our study, we found that 97% identity was the best cut-off for predicting survival. This cut-off enabled the delimitation of HM/SM vs. MBM/TU MCL and defined a significant difference in the overall survival of these two subgroups of patients. On these grounds, it is not unreasonable to claim that the inability of previous studies to detect clinical implications for SHM in MCL may be due, at least in part, to the application of the “CLL-relevant” 2% cut-off and the relatively lower number of cases with high SHM that reduced the statistical power of the analysis.

In keeping with previous studies (18,20,26), we found that nodal presentation and SOX11 expression were also predictors of poor outcome but, interestingly, in the multivariate analysis only the *IGHV* gene mutational status and SOX11 expression remained as independent variables. A recent study by Nygren et al (43) has shown an apparently conflicting result with SOX11-negative MCL having a worse prognosis than SOX11-positive tumors. However, 9/13 (69%) of the SOX11-negative cases in that study were strongly positive for p53 by immunohistochemistry, suggesting that these tumors carried *TP53* gene mutations. These findings are concordant with our recent observation indicating that *TP53* mutations and 17p deletions in SOX11-negative MCL are associated with complex genomic karyotypes and a rapid clinical evolution, whereas SOX11-negative MCL with wild type *TP53*/17p have a very stable disease and a long survival (29). Altogether, these observations support the idea that MCL with mutated *IGHV*, SOX11-negativity and non-nodal clinical presentation may correspond to a subtype of the disease with more indolent behavior. However, the inactivation of *TP53*, similar to other small B-cell lymphomas, confers a more aggressive behavior with development of nodal dissemination and more rapid clinical evolution.

The comprehensive analysis of the BcR in MCL is modifying our views about its potential ontogeny and the role of antigen selection in the pathogenesis of the disease (17,44). The definition of a cell of origin for this tumor is facing the same challenges already encountered in CLL (15). The spectrum of SHM, the molecular evidence for antigen selection, and the differences in the GEP of the two major subsets of MCL according to SHM load raise the possibility, as suggested for CLL (15), of a scenario in

which the different subsets of MCL may be related to different normal counterparts. The postulated cells may include in addition to naïve B-cells for some TU tumors, intermediate cells between naïve and germinal center cells (45), transitional B-cells (46), or even a post-germinal center memory B-cells for the tumors with high load of SHM. Our GEP analysis of the two major subset of MCL supports this hypothesis with an enrichment of the naïve B-cell signature in MCL with unmutated *IGHV* and the memory B-cell signature in the mutated *IGHV* tumors.

In conclusion, our results suggest the idea that the mutational status of the *IGHV* genes and SOX11 expression recognize two major subsets of MCL with distinct molecular and genetic features and also distinct clinical presentation and evolution. The gene expression profile analysis supports relationship of MCL with unmutated and mutated *IGHV* with naïve and memory B-cells, respectively, reinforcing the hypothesis that they may correspond to different subtypes of the disease.

References

- (1) Swerdlow S, Campo E, Harris N, Jaffe E, Pileri S, Stein H, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Fourth Edition ed. Lyon: 2008.
- (2) Welzel N, Le T, Marculescu R, Mitterbauer G, Chott A, Pott C, et al. Templated nucleotide addition and immunoglobulin JH-gene utilization in t(11;14) junctions: implications for the mechanism of translocation and the origin of mantle cell lymphoma. *Cancer Res* 2001;61:1629-36.
- (3) Jares P, Colomer D, Campo E. Genetic and molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: perspectives for new targeted therapeutics. *Nat Rev Cancer* 2007;7:750-62.
- (4) Bea S, Campo E. Secondary genomic alterations in non-Hodgkin's lymphomas: tumor-specific profiles with impact on clinical behavior. *Haematologica* 2008;93:641-5.
- (5) Royo C, Salaverria I, Hartmann E, Rosenwald A, Campo E, Bea S. The complex landscape of genetic alterations in mantle cell lymphoma. *Semin Cancer Biol* 2011;5:322-34.
- (6) Bea S, Ribas M, Hernandez JM, Bosch F, Pinyol M, Hernandez L, et al. Increased number of chromosomal imbalances and high-level DNA amplifications in mantle cell lymphoma are associated with blastoid variants. *Blood* 1999;93:4365-74.
- (7) Perez-Galan P, Dreyling M, Wiestner A. Mantle cell lymphoma: biology, pathogenesis, and the molecular basis of treatment in the genomic era. *Blood* 2011;117:26-38.
- (8) Hartmann EM, Campo E, Wright G, Lenz G, Salaverria I, Jares P, et al. Pathway discovery in mantle cell lymphoma by integrated analysis of high-resolution gene expression and copy number profiling. *Blood* 2010;116:953-61.
- (9) Murray F, Darzentas N, Hadzidimitriou A, Tobin G, Boudjogra M, Scielzo C, et al. Stereotyped patterns of somatic hypermutation in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia: implications for the role of antigen selection in leukemogenesis. *Blood* 2008;111:1524-33.
- (10) Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;94:1848-54.
- (11) Zibellini S, Capello D, Forconi F, Marcatili P, Rossi D, Rattotti S, et al. Stereotyped patterns of B-cell receptor in splenic marginal zone lymphoma. *Haematologica* 2010;95:1792-6.
- (12) Bikos V, Darzentas N, Hadzidimitriou A, Davis Z, Hockley S, Traverse-Glehen A, et al. Over 30% of patients with splenic marginal zone lymphoma express the same immunoglobulin heavy variable gene: ontogenetic implications. *Leukemia* 2012;doi:10.1038/leu.2012.3.
- (13) Maura F, Cutrona G, Fabris S, Colombo M, Tuana G, Agnelli L, et al. Relevance of stereotyped B-cell receptors in the context of the molecular, cytogenetic and clinical features of chronic lymphocytic leukemia. *PLoS One* 2011;6:e24313.

- (14) Szankasi P, Bahler DW. Clinical laboratory analysis of immunoglobulin heavy chain variable region genes for chronic lymphocytic leukemia prognosis. *J Mol Diagn* 2010;12:244-9.
- (15) Chiorazzi N, Ferrarini M. Cellular origin(s) of chronic lymphocytic leukemia: cautionary notes and additional considerations and possibilities. *Blood* 2011;117:1781-91.
- (16) Stamatopoulos K. Antigens in CLL: themes and variations. *Blood* 2010;115:3855-6.
- (17) Hadzidimitriou A, Agathangelidis A, Darzentas N, Murray F, Lau-Larue MH, Bredo PL, et al. Is there a role for antigen selection in mantle cell lymphoma? Immunogenetic support from a series of 807 cases. *Blood* 2011;118:3088-95.
- (18) Orchard J, Garand R, Davis Z, Babbage G, Sahota S, Matutes E, et al. A subset of t(11;14) lymphoma with mantle cell features displays mutated IgVH genes and includes patients with good prognosis, nonnodal disease. *Blood* 2003;101:4975-81.
- (19) Agathangelidis A, Darzentas N, Hadzidimitriou A, Brochet X, Murray F, Yan XJ, et al. Stereotyped B-cell receptors in one third of chronic lymphocytic leukemia: towards a molecular classification with implications for targeted therapeutic interventions. *Blood* 2012;119:4467-75.
- (20) Fernandez V, Salamero O, Espinet B, Sole F, Royo C, Navarro A, et al. Genomic and gene expression profiling defines indolent forms of mantle cell lymphoma. *Cancer Res* 2010;70:1408-18.
- (21) Camacho FI, Algara P, Rodriguez A, Ruiz-Ballesteros E, Mollejo M, Martinez N, et al. Molecular heterogeneity in MCL defined by the use of specific VH genes and the frequency of somatic mutations. *Blood* 2003;101:4042-6.
- (22) Kienle D, Krober A, Katzenberger T, Ott G, Leupolt E, Barth TF, et al. VH mutation status and VDJ rearrangement structure in mantle cell lymphoma: correlation with genomic aberrations, clinical characteristics, and outcome. *Blood* 2003;102:3003-9.
- (23) Schraders M, Oeschger S, Kluijn PM, Hebeda K, Schuurin E, Groenen PJ, et al. Hypermutation in mantle cell lymphoma does not indicate a clinical or biological subentity. *Mod Pathol* 2009;22:416-25.
- (24) Walsh SH, Thorselius M, Johnson A, Soderberg O, Jerkeman M, Bjorck E, et al. Mutated VH genes and preferential VH3-21 use define new subsets of mantle cell lymphoma. *Blood* 2003;101:4047-54.
- (25) Thorselius M, Walsh S, Eriksson I, Thunberg U, Johnson A, Backlin C, et al. Somatic hypermutation and V(H) gene usage in mantle cell lymphoma. *Eur J Haematol* 2002;68:217-24.
- (26) Ondrejka SL, Lai R, Kumar N, Smith SD, Hsi ED. Indolent mantle cell leukemia: clinicopathologic variant characterized by isolated lymphocytosis, interstitial bone marrow involvement, kappa light chain restriction, and good prognosis. *Haematologica* 2011;96:1121-7.
- (27) Cogliatti SB, Bertoni F, Zimmermann DR, Henz S, Diss TC, Ghielmini M, et al. IgV H mutations in blastoid mantle cell lymphoma characterize a subgroup with a tendency to more favourable clinical outcome. *J Pathol* 2005;206:320-7.

- (28) Thelander EF, Walsh SH, Thorselius M, Laurell A, Landgren O, Larsson C, et al. Mantle cell lymphomas with clonal immunoglobulin V(H)3-21 gene rearrangements exhibit fewer genomic imbalances than mantle cell lymphomas utilizing other immunoglobulin V(H) genes. *Mod Pathol* 2005;18:331-9.
- (29) Royo C, Navarro A, Clot G, Salaverria I, Giné E, Jares P, et al. Non-nodal type of mantle cell lymphoma is a specific biological and clinical subgroup of the disease. *Leukemia* 2012; doi: 10.1038/leu.2012.72.
- (30) Giudicelli V, Duroux P, Ginestoux C, Folch G, Jabado-Michaloud J, Chaume D, et al. IMGT/LIGM-DB, the IMGT comprehensive database of immunoglobulin and T cell receptor nucleotide sequences. *Nucleic Acids Res* 2006;34:D781-D784.
- (31) Lefranc MP, Giudicelli V, Ginestoux C, Jabado-Michaloud J, Folch G, Bellahcene F, et al. IMGT, the international ImmMunoGeneTics information system. *Nucleic Acids Res* 2009;37:D1006-D1012.
- (32) Brochet X, Lefranc MP, Giudicelli V. IMGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis. *Nucleic Acids Res* 2008;36:W503-W508.
- (33) Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. 3 ed. 2004. p. Article 3.
- (34) Mozos A, Royo C, Hartmann E, De JD, Baro C, Valera A, et al. SOX11 expression is highly specific for mantle cell lymphoma and identifies the cyclin D1-negative subtype. *Haematologica* 2009;94:1555-62.
- (35) Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordonez GR, Villamor N, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 2011;475:101-5.
- (36) Bea S, Salaverria I, Armengol L, Pinyol M, Fernandez V, Hartmann EM, et al. Uniparental disomies, homozygous deletions, amplifications, and target genes in mantle cell lymphoma revealed by integrative high-resolution whole-genome profiling. *Blood* 2009;113:3059-69.
- (37) Rosenwald A, Wright G, Wiestner A, Chan WC, Connors JM, Campo E, et al. The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma. *Cancer Cell* 2003;3:185-97.
- (38) Blenk S, Engelmann JC, Pinkert S, Weniger M, Schultz J, Rosenwald A, et al. Explorative data analysis of MCL reveals gene expression networks implicated in survival and prognosis supported by explorative CGH analysis. *BMC Cancer* 2008;8:106.
- (39) Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, Boudjograh M, Guida G, Smilevska T, et al. Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: Pathogenetic implications and clinical correlations. *Blood* 2007;109:259-70.
- (40) Arons E, Suntum T, Stetler-Stevenson M, Kreitman RJ. VH4-34+ hairy cell leukemia, a new variant with poor prognosis despite standard therapy. *Blood* 2009;114:4687-95.

- (41) Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;94:1840-7.
- (42) Forconi F, Sozzi E, Cencini E, Zaja F, Intermesoli T, Stelitano C, et al. Hairy cell leukemias with unmutated IGHV genes define the minor subset refractory to single-agent cladribine and with more aggressive behavior. *Blood* 2009;114:4696-702.
- (43) Nygren L, Baumgartner WS, Klimkowska M, Christensson B, Kimby E, Sander B. Prognostic role of SOX11 in a population-based cohort of mantle cell lymphoma. *Blood* 2012;119:4215-23.
- (44) Agathangelidis A, Hadzidimitriou A, Rosenquist R, Stamatopoulos K. Unlocking the secrets of immunoglobulin receptors in mantle cell lymphoma: implications for the origin and selection of the malignant cells. *Semin Cancer Biol* 2011;21:299-307.
- (45) Kolar GR, Mehta D, Pelayo R, Capra JD. A novel human B cell subpopulation representing the initial germinal center population to express AID. *Blood* 2007;109:2545-52.
- (46) Sims GP, Ettinger R, Shirota Y, Yarboro CH, Illei GG, Lipsky PE. Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood* 2005;105:4390-8.

Table 1. Clinico-biological characteristics of MCL patients according to the mutational status of *IGHV*.

	Total	HM (<95%)	SM (95%-96.9)	MBM (97%-99.9%)	TU (100%)	<i>P</i>
No. of cases (%)	177	30 (17%)	33 (19%)	71 (40%)	43 (24%)	
Pathological and molecular data						
Morphology						0.045
Classical/ small cell (%)	71/95 (75)	6/6 (100)	8/13 (66)	29/44 (66)	28/32 (87)	
Blastoid/ pleomorphic (%)	24/95 (25)	0/6	5/13 (38)	15/44 (34)	4/32 (13)	
Ki-67 (≥35%)	24/75 (32)	1/8 (12)	4/10 (40)	14/34 (41)	5/23 (22)	0.249
CD5-positive	72/83 (87)	9/16 (56)	11/13 (85)	32/34 (94)	20/20 (100)	<0.001
SOX11-positive	111/161 (69)	5/26 (19)	11/26 (42)	57/67 (85)	38/42 (90)	<0.001
CNA, mean number (range)	12.4 (0-50)	2.8 (0-26)	6.3 (0-33)	9.5 (0-50)	8.6 (0-34)	<0.001
High genomic complexity (≥4 CNA)	62/101 (61)	4/18 (22)	6/16 (37)	30/39 (77)	22/28 (79)	<0.001
<i>TP53</i> mutated	21/85 (25)	3/12 (25)	3/13 (23)	12/35 (37)	2/25 (8)	0.083
17p alteration/ <i>TP53</i> mutated	33/109 (30)	7/20 (35)	4/17 (23)	15/43 (35)	7/29 (24)	0.676
Clinical data						
Median age (range)	66 (29-90)	68 (45-88)	70 (44-85)	66 (29-89)	63 (33-90)	
Ratio Male/Female	112/39	11/11	17/8	51/13	33/7	0.027
Lymph node (>1 cm) (%)	84/122 (69)	5/19 (26)	9/18 (50)	42/50 (84)	28/35 (80)	<0.001
Palpable splenomegaly (%)	67/110 (60)	7/16 (44)	7/16 (44)	30/47 (63)	23/31 (74)	0.094
High serum LDH (>450) (%)	30/77 (39)	2/14 (14)	3/11 (27)	14/33 (42)	11/18 (61)	0.044
Stage IV (%)	70/79 (89)	7/8 (88)	7/10 (70)	32/35 (91)	24/26 (92)	0.246
Lymphocytosis (median, L/mm ³)	8800	10812	11368	18374	38633	0.396
Follow up data						
Median follow-up, years (range)	3.25 (0.23-21)	4.08 (0.33-8)	3.50 (0.50-21)	3.63 (0.23-12)	2.65 (0.68-6.58)	0.748
Chemotherapy at any time (%)	105/118 (89)	13/19 (68)	13/18 (72)	47/49 (96)	32/32 (100)	<0.001
Median time to treatment (months)	1	4.4	2	1	1	0.157
Complete response rate (%)	30	15	15	52	19	0.02
5-year overall survival (%)	46	62	55	49	25	0.023

Table 2. Analysis for overall survival in MCL patients.

Variable	N	Events	OS (months)		Multivariate analysis		
			5-year OS (95% CI)	<i>P</i>	RR	95% CI	<i>P</i>
Age ^a				0.019	1.03	1.01-1.06	0.001
Gender				0.514			
Female	25	20	61 (43-79)				
Male	98	58	56 (41-70)				
LDH				<0.001			
Low	45	23	72 (40-104)				
High	29	23	17 (12-22)				
Lymphocytes (log ₁₀ L/mm ³)				0.22			
≥ 4	42	22	46 (44-48)				
< 4	40	23	38 (36-40)				
Nodal presentation				0.004			
No	38	17	81 (59-103)				
Yes	80	53	47 (34-59)				
Morphology				0.001			
Classical	64	42	57 (50-64)				
Blastoid	22	18	23 (3-43)				
Ki67				<0.001			
High (≥35%)	45	30	53 (37-69)				
Low (<35%)	22	18	18 (0-36)				
IGHV gene				0.004	2.01	1.08-3.74	0.029
Mutated (<97%)	40	18	84 (20-148)				
Unmutated (≥97%)	80	64	50 (38-62)				
SOX11 expression				0.003	2.44	1.22-4.9	0.012
Negative	34	14	84 (12-156)				
Positive	10	66	48 (38-58)				
	0						
TP53 status ^b				<0.001			
Wild type	31	14	59 (38-80)				
Mutated	19	17	19 (0-39)				
17p/TP53 ^b				<0.001			
Not altered	60	24	53 (17-53)				
Altered	28	22	25 (6-44)				

^aAge was treated as a continuous variable.

^bSurvival for *TP53* and 17p/*TP53* alterations was calculated from the time of sample assessment instead of from time of diagnosis.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Distribution of rearrangements of the six more frequent *IGHV* genes in subgroups of MCL with different mutational status.

Figure 2. *IGHV* mutational load according to SOX11 expression. A, Box plot of the percentage of *IGHV* identity in MCL cases negative and positive for SOX11 expression. B, Distribution of the cases according to four subgroups of *IGHV* gene mutational status and SOX11 expression.

Figure 3. Characterization of MCL cases according to their distinct genetic and molecular features. The 101 cases in which SNP-array analyses were performed are represented. In the upper panel the number of genomic alterations (bar plots) and the % of identity of *IGHV* genes (from left to right in decreasing order).

Figure 4. A, Differences in the gene expression profile between U-MCL and M-MCL. Heatmap displaying the main pathways enriched among the genes differentially expressed. B, Enrichment plots obtained from GSEA. Significant enrichment of the naïve B-cell gene set in the U-MCL/SOX11-positive and significant enrichment of the memory B-cell gene set in M-MCL/SOX11-negative.

Figure 5. Kaplan-Meier estimates of OS for MCL patients according to *IGHV* gene mutational status and SOX11 expression. A, OS for the four different subgroups of *IGHV* identity. HM and SM have better OS (5-year OS 61%, 95% confidence interval [CI], 35-87 and 5-year OS 55%, 95% CI, 29-81, respectively) compared to MBM (5-year OS 14%, 95% CI, 34-62) and TU (5-year OS 18%, 95% CI, 7-43). B, OS subgroups of MCL with <97% (Unmutated U-MCL) and ≥97% (Mutated M-MCL) identity. M-MCL showed better OS (5-year OS 59%, 95% CI, 41-77) than U-MCL (5-year OS 40%, 95% CI, 28-52). C, OS according to *IGHV* gene mutational status and SOX11 expression. M-MCL SOX11-negative showed a better OS (5-year OS 73%, 95% CI, 52-94) than the other groups (M-MCL SOX11-pos: 5-year OS 42%, 95% CI, 12-72; U-MCL SOX11-neg: 5-year OS 48%, 95% CI, 13-83; U-MCL SOX11-pos: 5-year OS 38%, 95% CI, 26-50). D, OS of the M-MCL SOX11-negative patients with 17p/*TP53* alterations showed a worse OS (5-year OS 36%, 95% CI, 0-76) than patients without 17p/*TP53* alterations (5-year OS 92%, 95% CI, 77-100).

FIGURES

Figure 1

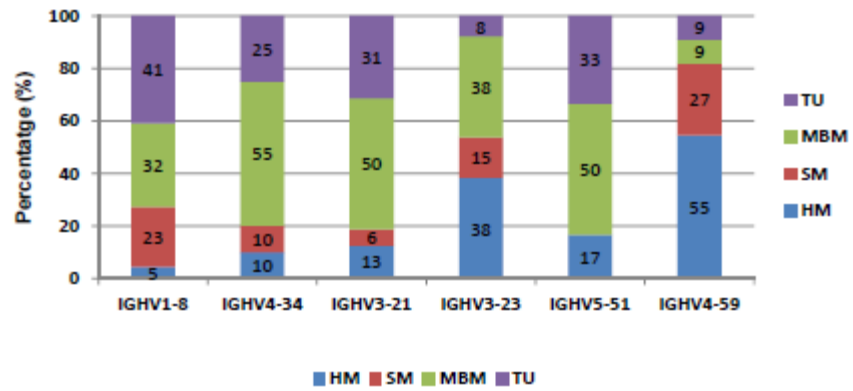


Figure 2

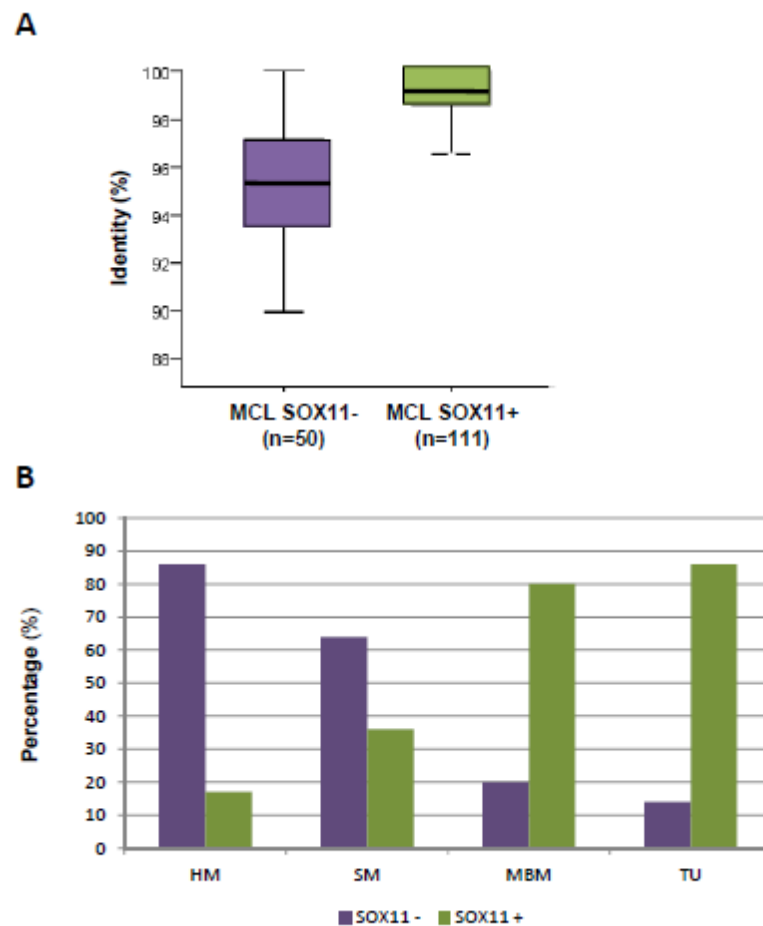


Figure 3

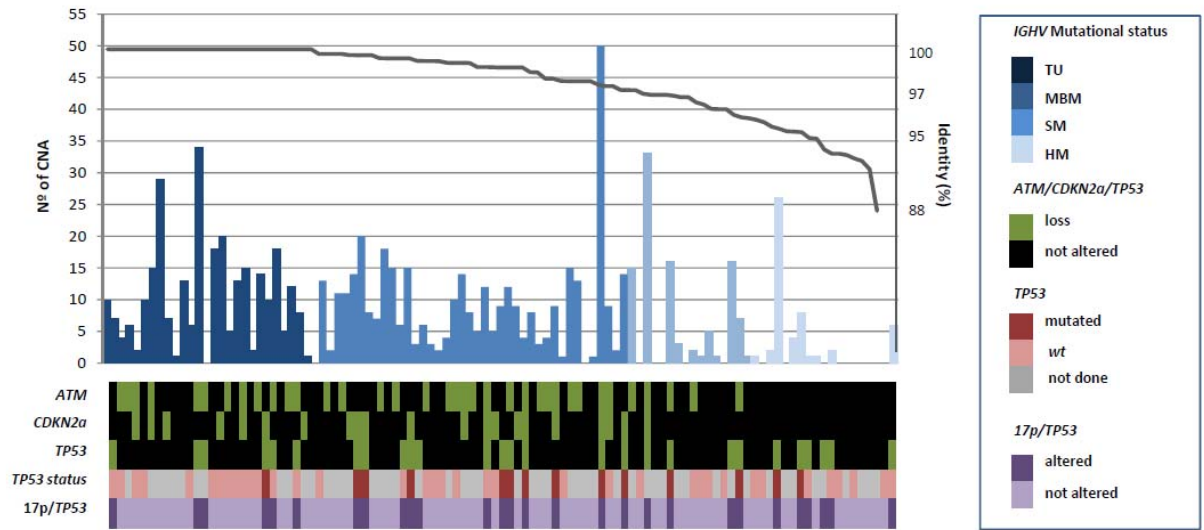


Figure 4

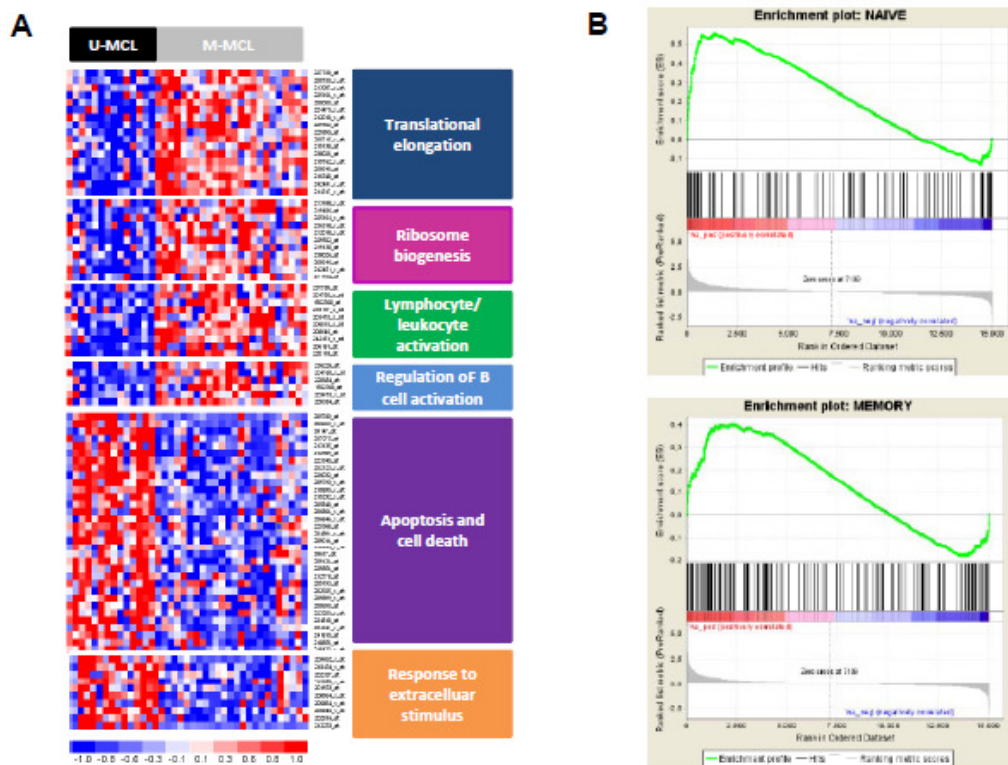
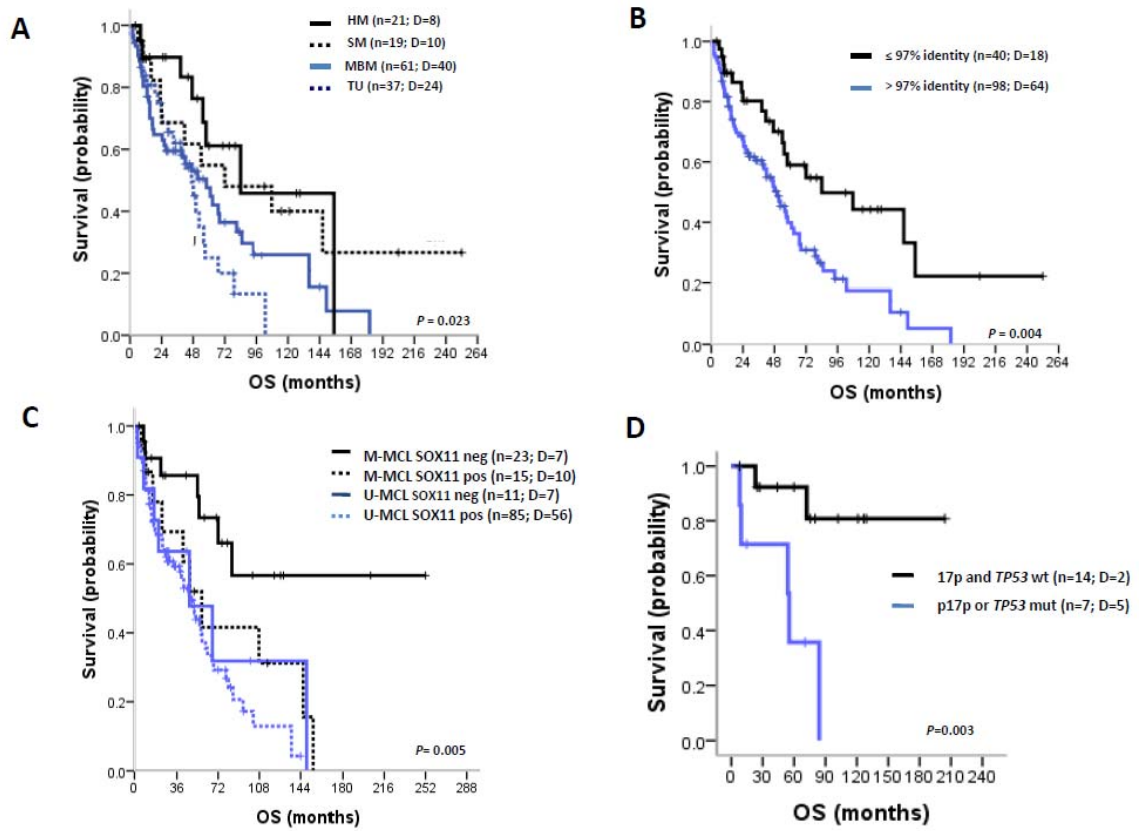


Figure 5



ARTICLE 2: Els limfomes de cèl·lules del mantell de tipus no ganglionar són un subgrup biològic i clínicament específic de la malaltia

Leukemia. Març del 2012. 19. doi: 10.1038/leu.2012.7

Resum:

Un subgrup de pacients de limfoma de cèl·lules del mantell (LCM) segueix un curs clínic indolent i pot requerir diferents estratègies de maneig comparant amb LCM convencionals. No obstant, els criteris per reconèixer aquests pacients no estan ben definits. L'objectiu d'aquest l'estudi és determinar si la signatura d'expressió diferencial entre els LCM convencionals i indolents pot identificar subgrups de LCM amb diferents característiques. Vam analitzar una signatura de 3 gens (*SOX11*, *HDGFRP3*, *DBN1*) detectada per qPCR que va ser investigada en mostres tumorals de sang perifèrica de 68 pacients de LCM. Vam identificar una expressió baixa d'aquests gens en un subgrup de 22 pacients que principalment no presentaven adenopaties, presentaven mutacions en els gens de les IG, tenien poques alteracions genòmiques i estaven associats a un millor pronòstic respecte els 46 casos de LCM amb expressió elevada d'aquesta signatura (supervivència als 5anys 75% vs 32%, $P=0.006$). La presència d'alteracions en 17p/*TP53* conferia pitjor pronòstic en ambdós grups, independentment de l'alta o baixa expressió de la signatura. Aquesta troballa suggereix que els LCM sense presentació ganglionar i baixa expressió dels 3 gens de la signatura són un subtipus específic de la malaltia. L'estudi dels 3 gens i de l'estat de 17p/*TP53* podria ajudar en l'elaboració d'estratègies de gestió d'aquest tipus de pacients.

Leukemia (2012) 1–4

© 2012 Macmillan Publishers Limited All rights reserved 0887-6924/12

www.nature.com/leu

LETTER TO THE EDITOR

Non-nodal type of mantle cell lymphoma is a specific biological and clinical subgroup of the disease

Leukemia advance online publication, 13 April 2012;
doi:10.1038/leu.2012.72

Mantle cell lymphoma (MCL) is an aggressive B-cell neoplasm with a median survival of the patients of 3–5 years.¹ This aggressive behavior has been related to its genetic and molecular pathogenesis that integrates the deregulation of cell proliferation due to the t(11;14)(q13;q32) and cyclin D1 overexpression, and the accumulation of a high number of chromosomal aberrations mainly targeting genes related to DNA damage response and the cell survival pathways.² Thus, it is usually recommended that patients with MCL should be treated with chemotherapeutic regimens immediately following their diagnosis. However, this attitude is being reconsidered, due in part to the increasing recognition of subsets of patients that do not need therapy for a long period of time^{3–7} and the observation that deferral of treatment does not seem to impair their global outcome.^{3,5} The identification of asymptomatic patients at diagnosis that may benefit from initial watch and wait approach is challenging because some studies have shown that intensive treatment may improve the survival of patients with MCL.⁸ Therefore, it is of paramount importance to develop clinical and biological criteria that may assist in the selection of the optimal individual management for patients with MCL.

In a recent study, we compared a subgroup of MCL patients with a very indolent clinical behavior that did not received chemotherapy for more than 2 years with a subset of patients that required treatment at diagnosis.⁴ The indolent MCL had a profile of clinical and biological features that differed from the conventional MCL (cMCL), suggesting that at least a subset of cases might correspond to a particular biological subtype of the disease. One of the major findings was the differential expression of a small signature of 13 genes, including *SOX11*, that was highly expressed in cMCL but negative or very low in indolent tumors.⁴

The aim of the present study was to determine whether the recognition of this gene expression signature in an independent and larger series of patients could identify subgroups of MCL with different biological and clinical features and may assist in devising management strategies more accordingly to the biology of the disease.

We designed and validated a simple quantitative PCR assay using three genes (*SOX11*, *HDGFRP3* and *DBN1*) of the previously described gene signature differentially expressed between indolent and cMCL⁴ (Supplementary Table S1 and Supplementary Figures S1 and S2).

Because indolent MCL frequently presented with a leukemic non-nodal disease, we studied this simplified three-gene signature and *CCND1* expression in blood samples from a series of 68 MCL and 42 leukemic non-MCL neoplasms. *SOX11*, *HDGFRP3*, *DBN1* and *CCND1* were highly expressed in MCL but were negative in the 42 non-MCL samples (Supplementary Table S1 and Supplementary Figure S2). *CCND1* was overexpressed in all MCL but the expression of the other three genes was variable, with a subset of MCL showing low or negative expression. To determine the significance of the variable expression of the three-gene

signature, we performed an unsupervised hierarchical clustering analysis of the tumors according to the expression of this three-gene signature. This analysis identified two clusters of MCL with relatively concordant high ($n=46$ cases) or low ($n=22$ cases) expression of the three genes (Supplementary Table S1 and Supplementary Figures S3 and S4).

These two subgroups of MCL had significant differences in clinical and biological features (Table 1). Palpable lymphadenopathy (>1 cm) was detected more frequently at diagnosis in patients carrying tumors with high than low expression signature (77% vs 12%; $P<0.001$). Patients with high signature were more frequently treated with chemotherapy during the evolution of the disease (93%) than patients with low expression (58%) ($P=0.001$). Anthracycline-containing regimens were administered in 78% and 60% of cases treated in the subgroup of MCL with high and low signature, respectively. The clinical outcome was significantly different in these two subgroups of patients with a 5-year overall survival (OS) rate of 32% (95% confidence interval (CI), 11–53) for the group with high expression signature and 75% (95% CI, 48–100) for patients with low expression signature ($P=0.006$) (Table 1 and Figure 1a).

The *IGHV* genes were mutated ($\leq 97\%$ identity) in 77% of the tumors with low signature but only in 17% with high signature ($P<0.001$) (Table 1). The genomic profile was analyzed in 36 tumors with high and 17 with low signature using SNP6.0 arrays (Supplementary Figure S5). Both subgroups had the characteristic profile of chromosomal imbalances of MCL^{9,10} but tumors with high signature had significantly more gains of 3q and losses of 9p and 11q ($P=0.016$, 0.007 and 0.029, respectively). Genomic complexity (copy number alterations ≥ 5 per case) was significantly more frequent in MCL with high expression signature (29/36, 80%) than in tumors with low expression signature (6/17, 35%) ($P=0.001$). Interestingly, the six cases with low signature carrying complex genomes had 17p loss, and *TP53* mutations were detected in the five cases studied. *TP53* mutations were also detected in 6 of the 10 MCLs with high signature that had 17p alterations (Supplementary Table S2).

The variables predicting for poor OS were the high expression of the three-gene signature, nodal presentation and unmutated *IGHV* ($P=0.01$, 0.03 and 0.05, respectively) (Supplementary Table S3). The combined three-gene signature provided a better prediction of OS than any of the three genes individually (Supplementary Figure S6). To determine whether the three-gene signature added information to the nodal presentation, we compared the clinical impact of these two variables (Figure 1b). Patients with non-nodal presentation and low signature had a better outcome (5-year OS 86%, 95% CI, 67–100) than patients with non-nodal presentation and high signature (5-yr OS 42%, 95% CI, 1–83). Patients with nodal presentation had a poor outcome regardless of the expression levels of the signature. Although only two patients had lymphadenopathy and low signature, these two patients were treated at diagnosis. The association of non-nodal presentation with a better outcome was in agreement with previous clinical observations.^{7,11} However, our study also indicates that patients with leukemic presentation without lymphadenopathy can be further stratified based on the



Table 1. Main features of MCL patients according to the high (HsMCL) or low (LsMCL) expression levels of the 3-gene signature

	Total MCL (N = 68)	HsMCL (N = 46)	LsMCL (N = 22)	P-value
Median age (range)	67 (35–90)	66 (35–90)	70 (44–88)	0.3
Ratio Male/female	3.1/1	3.8/1	2.4/1	0.5
<i>Clinical and pathological data</i>				
Nodal presentation (lymph nodes > 1 cm) (%)	32/56 (57)	30/39 (77)	2/17 (12)	<0.001
Splenomegaly (%)	32/52 (61)	26/39 (67)	6/13 (46)	0.2
Extranodal involvement ^a	7/61 (11)	6/44 (17)	1/17 (6)	0.3
WBC count > 10 × 10 ⁹ /l (%)	21/32 (66)	14/24 (58)	7/8 (87)	0.1
High serum LDH (%)	10/29 (34)	9/22 (41)	1/7 (14)	0.2
<i>Evolutive data</i>				
Median follow-up, months (range) ^b	30.8 (4–252)	28.6 (8–252)	44.6 (4–94)	0.1
Chemotherapy at any time (%)	50/59 (85)	40/42 (93)	10/17 (58)	0.001
Median time to treatment, months	1.4	1.1	6.4	0.1
Complete response rate (%)	7/26 (27)	5/22 (23)	2/4 (50)	0.3
5-year overall survival (%)	46	32	75	0.006
<i>Molecular data</i>				
IGHV gene identity ≤ 97 (%)	24/64 (37)	7/42 (17)	17/22 (77)	<0.001
Copy number alterations				
0–1 imbalance	12/53 (23)	3/36 (8)	9/17 (53)	
2–4 imbalances	6/53 (11)	4/36 (11)	2/17 (12)	
≥ 5 imbalances	35/53 (66)	29/36 (80)	6/17 (35)	0.001
17p alteration	16/53 (30)	10/36 (28) ^c	6/17 (35)	0.8

Abbreviations: HsMCL, high signature mantle cell lymphoma; LDH, lactate dehydrogenase; LsMCL, low signature MCL; WBC, white blood cell. ^aExtranodal involvement excluding peripheral blood and bone marrow involvement, which was present in all the patients. Extranodal sites were: lung, liver, Waldeyer's ring (in two patients each) and pleura, colon and testis (in one patient each). ^bSurviving patients. ^cSeven patients had 17p loss, whereas three patients had copy number neutral loss of heterozygosity.

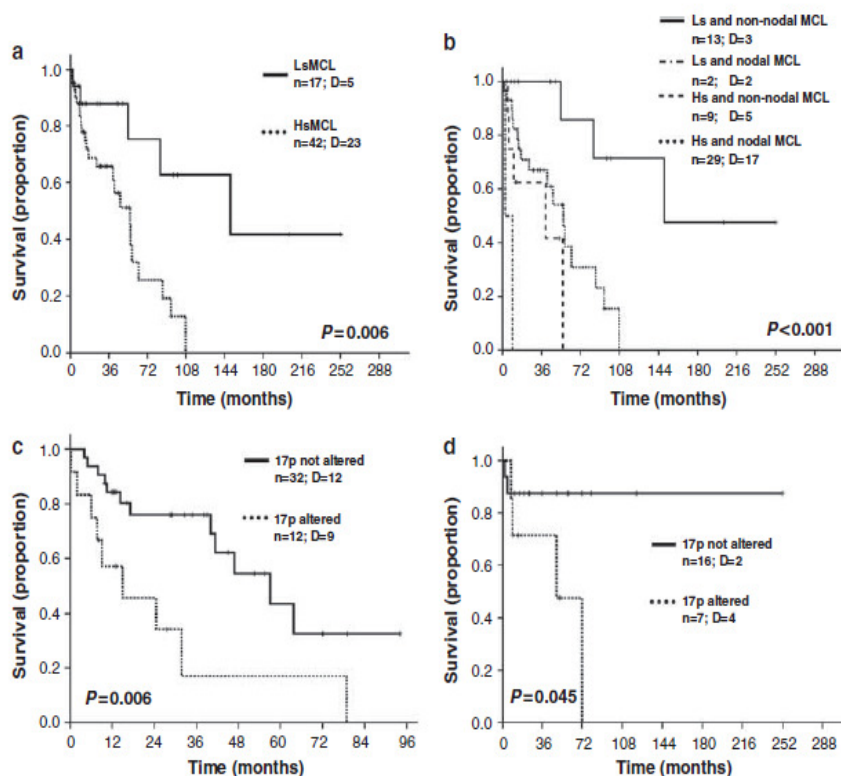


Figure 1. Survival curves of MCL. (a) Kaplan-Meier estimates of OS for 59 MCL patients according to the high (HsMCL, n = 42) or low (LsMCL, n = 17) expression of the three-gene signature. Two out of the five dead patients in the LsMCL group died of a MCL-unrelated cause but all patients in the HsMCL group died of the disease. (b) Kaplan-Meier estimates of OS for 53 MCL patients according to the presence of lymphadenopathy and the high or low three-gene expression signature. Patients with low signature and no lymphadenopathies show a better OS than the remaining three groups. (c) Survival curves for patients with high three-gene signature (HsMCL) according to 17p status (17p altered vs 17p not altered); and (d) Survival curves for patients with low three-gene signature (LsMCL) according to 17p status (17p altered vs 17p not altered).



three-gene signature. Non-nodal MCL with high expression signature had a more aggressive clinical behavior with significantly shorter OS than patients with low signature. These findings are particularly relevant because the presence of high white blood cell counts has been traditionally associated with a poor prognosis in MCL.¹² However, our study supports the idea that MCL patients with a non-nodal disease, high leukocyte count and low signature may correspond to a different subtype of the disease with different clinical behavior. The use of the three-gene signature may assist to distinguish these two groups of patients. Further studies in patients with nodal disease are needed to evaluate the impact of the signature on this group of MCL.

To have a broader overview and increase the statistical power in the evaluation of the prognostic parameters, we combined this series with the 17 patients from our previous study.⁴ The variables significantly predicting for poor OS were also the high expression of the three-gene signature, nodal presentation and unmutated *IGHV* ($P=0.001$, 0.013 and 0.006 , respectively). Interestingly, patients with high genomic complexity and 17p alterations had also a poor impact on survival calculated from the time of the genetic assessment ($P<0.001$). Of note, the detection of 17p alteration had a significant adverse prognosis in both subgroups of MCL with high ($P=0.006$) and low expression signature ($P=0.045$) (Figures 1c and d).

In spite of the global good prognosis of our patients with low signature, some of them died rapidly after diagnosis or developed progressive disease. Interestingly, the detection of a 17p deletion had an adverse impact on outcome in these patients, suggesting that similarly to cMCL and other lymphoid neoplasms, the acquisition of 17p/*TP53* alterations may also be a mechanism of tumor progression in MCL with low expression signature impairing the outcome of the patients.² This finding suggests that the evaluation of 17p/*TP53* alterations may be also important to refine the prognosis of patients with MCL. Intriguingly, although the presence of 17p alterations had a poor prognostic impact on both subgroups of MCL, patients with low signature had a longer survival than patients with high signature carrying 17p alterations (5-yr OS, 48% vs 17%). This observation parallels the finding of a subset of CLL patients with Binet stage A and mutated *IGHV* that had a stable disease in spite of the presence of 17p/*TP53* alterations.¹³

All the findings of the present study indicate that MCL presenting with a non-nodal disease and low expression of the three-gene signature may correspond to a particular clinical and biological subtype of the disease with a more indolent clinical behavior. The selection of a term to name this subtype of tumors is not easy. We suggest the term 'non-nodal type of MCL' because it reflects their major, although not entirely specific, clinical feature and, on the other hand, it may give credit to the initial clinical observations of this subgroup of tumors.^{7,14} The presence of 17p/*TP53* alterations in these patients impairs their outcome, suggesting that they may influence the progression of the disease. The evaluation of the three-gene signature in leukemic samples together with the study of 17p/*TP53* may help to identify this particular subtype of MCL and to determine a parameter of higher risk in the evolution of the patients, respectively.

It may be arguable whether non-nodal type of MCL corresponds to a totally different disease. However, the similar global genomic profile observed in this study and the similar global gene expression profile of both types of tumors identified in our previous study⁴ would favor the idea that they are subtypes of the same disease. In addition, a recent study of 'in situ MCL' has observed that 'in situ' lesions with SOX11-positive or -negative MCL-like cells have a similar distribution in the mantle-zone area of reactive follicles, indicating that early lesions in these two types of tumors share the same topographic microenvironment.¹⁵

In conclusion, our findings support the idea that non-nodal type of MCL with a low signature of these three genes may correspond to a specific subtype of the disease. The study of the three-gene

signature and 17p/*TP53* status may assist in devising management strategies for patients with MCL more adjusted to the biology of the disease.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study has been supported by 'Instituto de Salud Carlos III, Fondo Investigaciones Sanitarias' (FIS06/0150 and PI08/0077) (SB), the Spanish Ministry of Science and Innovation SAF 2008-03630 (EC), 'Red Temática de Investigación Cooperativa de Cáncer' (RTICC) RD06/0020/0039 (EC), RD06/0020/0051 (ALG) and RD06/0020/0014 (DC), Instituto de Salud Carlos III 'Beca Predoctoral de Formación en Investigación en Salud' (FI08/00437) (CR), Ministry of Science and Innovation 'Formación de Personal Investigador' (BES-2007-16330) (AN), European Regional Development Fund (ERDF) 'Una manera de fer Europa', European Mantle Cell Lymphoma Network, and Generalitat de Catalunya (2009-SGR-992) (EC).

C Royo^{1,13}, A Navarro^{1,13}, G Clot¹, I Salaverria^{1,2}, E Giné³, P Jares¹, D Colomer¹, A Wiestner⁴, WH Wilson⁴, MC Vegliante¹, V Fernandez¹, EM Hartmann⁵, N Trim⁶, WN Erber⁷, SH Swerdlow⁸, W Klapper⁹, MJS Dyer¹⁰, M Vargas-Pabón¹¹, G Ott¹², A Rosenwald⁵, R Siebert², A López-Guillermo³, E Campo^{1,14} and S Bea^{1,14}

¹Department of Pathology, Hematopathology Unit, Hospital Clinic, University of Barcelona, IDIBAPS, Barcelona, Spain;

²Institute of Human Genetics, University Hospital Schleswig-Holstein Campus Kiel/Christian-Albrechts University Kiel, Kiel, Germany;

³Department of Hematology, Hospital Clinic, Barcelona, Spain;

⁴Hematology Branch, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA;

⁵Institute of Pathology, University of Würzburg, Würzburg, Germany;

⁶Addenbrooke's Hospital, Cambridge, UK;

⁷School of Pathology and Laboratory Medicine, The University of Western Australia, Nedlands, Western Australia, Australia;

⁸University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA, USA;

⁹Department of Pathology, University Hospital Schleswig-Holstein Campus Kiel/Christian-Albrechts University Kiel, Kiel, Germany;

¹⁰MRC Toxicology Unit, Leicester University, Leicester, UK;

¹¹Hospital de Jario, Asturias, Spain and

¹²Department of Pathology, Robert-Bosch-Krankenhaus and Dr Margarete Fischer Institute of Clinical Pharmacology, Stuttgart, Germany

E-mail: sbea@clinic.ub.es

¹³These authors share authorship.

¹⁴These authors share senior authorship.

REFERENCES

- 1 Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H et al. In: (Eds.) *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. IARC: Lyon, 2008.
- 2 Royo C, Salaverria I, Hartmann E, Rosenwald A, Campo E, Bea S. The complex landscape of genetic alterations in mantle cell lymphoma. *Semin Cancer Biol* 2011; **5**: 322-334.
- 3 Eve HE, Furtado MV, Hamon MD, Rule SA. Time to treatment does not influence overall survival in newly diagnosed mantle-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2009; **27**: e189-e190.
- 4 Fernandez V, Salameró O, Espinet B, Sole F, Royo C, Navarro A et al. Genomic and gene expression profiling defines indolent forms of mantle cell lymphoma. *Cancer Res* 2010; **70**: 1408-1418.
- 5 Martin P, Chadburn A, Christos P, Weil K, Furman RR, Ruan J et al. Outcome of deferred initial therapy in mantle-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2009; **27**: 1209-1213.
- 6 Ondrejka SL, Lai R, Kumar N, Smith SD, Hsi ED. Indolent mantle cell leukemia: clinicopathologic variant characterized by isolated lymphocytosis, interstitial bone marrow involvement, kappa light chain restriction, and good prognosis. *Haematologica* 2011; **96**: 1121-1127.
- 7 Orchard J, Garand R, Davis Z, Babbage G, Sahota S, Matutes E et al. A subset of t(11;14) lymphoma with mantle cell features displays mutated *IgVH* genes



- and includes patients with good prognosis, nonnodal disease. *Blood* 2003; **101**: 4975–4981.
- 8 Geisler CH, Kolstad A, Laurell A, Andersen NS, Pedersen LB, Jerkeman M *et al*. Long-term progression-free survival of mantle cell lymphoma after intensive front-line immunochemotherapy with in vivo-purged stem cell rescue: a nonrandomized phase 2 multicenter study by the Nordic Lymphoma Group. *Blood* 2008; **112**: 2687–2693.
 - 9 Bea S, Salaverria I, Armengol L, Pinyol M, Fernandez V, Hartmann EM *et al*. Uniparental disomies, homozygous deletions, amplifications, and target genes in mantle cell lymphoma revealed by integrative high-resolution whole-genome profiling. *Blood* 2009; **113**: 3059–3069.
 - 10 Hartmann EM, Campo E, Wright G, Lenz G, Salaverria I, Jares P *et al*. Pathway discovery in mantle cell lymphoma by integrated analysis of high-resolution gene expression and copy number profiling. *Blood* 2010; **116**: 953–961.
 - 11 Martin P, Leonard J. Is there a role for “watch and wait” in patients with mantle cell lymphoma? *Semin Hematol* 2011; **48**: 189–193.
 - 12 Ferrer A, Bosch F, Villamor N, Rozman M, Graus F, Gutierrez G *et al*. Central nervous system involvement in mantle cell lymphoma. *Ann Oncol* 2008; **19**: 135–141.
 - 13 Best OG, Gardiner AC, Davis ZA, Tracy I, Ibbotson RE, Majid A *et al*. A subset of Binet stage A CLL patients with TP53 abnormalities and mutated IGHV genes have stable disease. *Leukemia* 2009; **23**: 212–214.
 - 14 Angelopoulou MK, Siakantaris MP, Vassiliakopoulos TP, Kontopidou FN, Rassidakis GZ, Dimopoulou MN *et al*. The splenic form of mantle cell lymphoma. *Eur J Haematol* 2002; **68**: 12–21.
 - 15 Carvajal-Cuenca A, Sua LF, Silva NM, Pittaluga S, Royo C, Song JY *et al*. In situ mantle cell lymphoma: clinical implications of an incidental finding with indolent clinical behavior. *Haematologica* 2012; **97**: 270–278.

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

INFORMACIÓ SUPLEMENTÀRIA

1. Supplementary Patients and methods

- 1.1. **Patients**
- 1.2. **Isolation of tumor cells and nucleic acid extraction**
- 1.3. **Quantitative PCR and design of a 3-gene signature**
- 1.4. ***IGHV* gene mutational status**
- 1.5. **Copy number analysis**
- 1.6. ***TP53* mutational analysis**
- 1.7. **Statistical analysis**

2. Supplementary results

- 2.1. **Design of a simplified 3-gene signature qPCR assay**
- 2.2. **Sequential analysis of the 3-gene signature**

3. Supplementary tables

- 3.1. **Table S1**
- 3.2. **Table S2**
- 3.3. **Table S3**

4. Supplementary figures

- 4.1. **Figure S1**
- 4.2. **Figure S2**
- 4.3. **Figure S3**
- 4.4. **Figure S4**
- 4.5. **Figure S5**
- 4.6. **Figure S6**

5. Supplementary references

1. Supplementary Patients and methods

1.1 Patients

We initially selected 17 MCL patients from our previous gene expression profiling (GEP) study to design a quantitative polymerase chain reaction (qPCR) assay that could capture the information of the GEP signature distinguishing indolent and conventional MCL.(Fernandez et al., 2010) These patients were selected based on the availability of RNA to design a qPCR assay. This assay was compared in relation to the GEP data in this initial set of cases (n=17). Then, it was used in a second independent series (n=68) of MCL patients. The patients were included in the study based on the availability of a peripheral blood sample for molecular studies obtained before treatment. All cases had the t(11;14)(q13,q32) and/or cyclin D1 overexpression. The patients were collected between 1992 and 2010 from Health Centers in Spain, Germany, United Kingdom, and United States. None of these patients had been included in our previous study.(Fernandez et al., 2010) Since the qPCR analysis was performed in peripheral blood samples, a minimum of 30% of tumor cells was required to include patients in the study, regardless of the total lymphocyte count. This cut-off was selected based on dilutional experiments performed to evaluate the sensitivity of the assay. Clinical follow-up was available in 59 patients. In nine patients sequential leukemic samples were also analyzed.

To compare the expression of this signature in MCL and in other leukemic B-cell neoplasms we analyzed 23 chronic lymphocytic leukemias, 8 splenic marginal zone lymphomas, 5 hairy cell leukemias, 5 follicular lymphomas, and 1 lymphoplasmacytic lymphoma. CCND1 expression was also assessed in the non-MCL leukemic samples.

The study was approved by the Institutional Review Board of the respective institutions.

1.2 Isolation of tumor cells and nucleic acid extraction

The samples were obtained from peripheral blood in all cases. The tumor cell population was at least 30% of the white blood cell count (mean: 79%, range: 31-98%). In four cases with less than 50% of tumor cells, the B-cells were purified using anti-CD19 magnetic microbeads (Miltenyi Biotech) reaching a final tumor content of at least 80% as determined by flow cytometry. Genomic DNA and total RNA were extracted using the AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen, Germantown, MA, USA). The potential

residual DNA in the RNA fraction was removed using the TURBO DNA-free™ Kit from Ambion (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

1.3 Quantitative PCR and design of a 3-gene signature

Complementary DNA (cDNA) synthesis was carried out from 500-800ng of total RNA and the product was amplified and quantified using TaqMan® Universal PCR Master Mix and TaqMan® Gene Expression Assays: Hs00765553_m1 (*CCND1*), Hs00428063_m1 (*CDK2AP1*), Hs00365623_m1 (*DBN1*), Hs00998956_m1 (*PON2*), Hs01016931_m1 (*RNGTT*) (Applied Biosystems) and Fluorescent probes TaqMan®MGB and primers designed using Primer Express® Version 2.0: *SOX11* (probe 5'-TTTTAACCACGGATAATTG-3'; forward primer 5'-CATGTAGACTAATGCAGCCATTGG-3'; reverse primer 5'-CACGGAGCACGTGTCAATTG-3'); *HDGFRP3* (probe 5'-CGGGCAACGACACAA-3'; forward primer 5'-GCAGCTCTGAGGGTGGAGAT-3'; reverse primer 5'-TTTCTGCAAGTCTGAAGTTGTGTTT-3'); and *HMGB3* (probe 5'-CATTATTTGTGGTGCCCAAC-3'; forward primer 5'-CCGTGCTCCTGGCACATAT-3'; reverse primer 5'-GCAGGCTCAAGACCCCAAA-3'). cDNA was analyzed using duplicates in an ABI Prism 7900HT Fast Sequence Detection System (Applied Biosystems). Relative quantification of gene expression was analyzed with the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method using *GUSB* as the endogenous control and Universal Human Reference RNA (Stratagene, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) as the calibrator. A simplified 3-gene signature was calculated by summing the values of the three standardized genes. For each gene the standardization was performed by subtracting the mean and then dividing by the standard deviation.

1.4 IGHV gene mutational status

The study of the *IGHV* mutational status was performed in 64 MCL using genomic DNA or cDNA. The *IGHV-IGHD-IGHJ* amplification was performed as reported previously (Hadzidimitriou et al., 2011) or following the BIOMED-2 protocol (van Dongen et al., 2003) For the analysis we used all the sequences that were in-frame and excluded any partial or unproductive rearrangements. PCR products were purified by excising the band from a 2% agarose gel with the NucleoSpin Extract II Kit (Machery-Nagel). PCR amplicons were subjected to direct sequencing. The sequences were aligned to immunoglobulin sequence database – IMGT® databases, IMGT/V-

Quest tool (<http://www.imgt.org>) and Ig BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast>). We classified the cases in two different groups: patients with mutated *IGHV* ($\leq 97\%$ homology with the germline gene) and patients with non-mutated *IGHV* ($>97\%$ homology). (Hadzidimitriou et al., 2011)

1.5 Copy number analysis

Copy number alterations and loss of heterozygosity (LOH) of 53 MCL leukemic cases was investigated with the Genome-Wide Human SNP Array 6.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA). Briefly, 500ng of tumor DNA was digested with NspI and StyI restriction enzymes, and ligated to adaptors. After ligation and PCR, the DNA was fragmented, labeled and hybridized. The hybridizations were performed using the high throughput protocol. The arrays were washed using Affymetrix fluidics station and scanned with the Gene Chip Scanner 3000. Image data were analyzed with Affymetrix GeneChip Command Console software version 1.1 following the manufacturer's recommendations. Data analysis was performed using the Genotyping Console 4.0 to obtain the CEL data files. For array quality control genotypes were called using Birdseed v2.0, and only samples passing the recommended values for Contrast Quality Control (CQC) >0.4 and Median of the Absolute values of all Pairwise Differences (MAPD) <0.35 were used. CN5 algorithm of the Affymetrix Genotyping Console was used with normal references from the public HapMap Sample Data Set (270 samples). Regional GC correction and the standard segment reporting tool filters were used (minimum of 5 markers per segment and 100 Kb minimum genomic size of a segment) as well as visual inspection of copy number alterations (CNA). SNP6.0 arrays were hybridized at CeGen, Santiago de Compostela, Spain (www.cegen.org). Nine samples subjected to copy number analysis had tumor contents lower than 70% (range 52%-68%) as detected by flow cytometry, although this did not affect significantly the detection of copy number alterations, as we have also previously observed using SNP array 100K. (Bea et al., 2009)

1.6 TP53 mutational analysis

The detection of the *TP53* gene mutations was investigated as described in the International Agency for Research on Cancer (IARC) Consortium within exons 4-11. The mutations were analyzed using Multiple Sequence Alignment tools (ClustalW; <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>) and the wild type sequences from the IARC

Database (<http://www-p53.iarc.fr>). All mutations were confirmed in both the forward and reverse strands and the presence of deleterious mutations (non-functional protein) was obtained from IARC Database.

1.7 Statistical analysis

Statistical tests were performed using SPSSv17 (SPSS, Chicago, IL, USA) and R softwares. A hierarchical clustering using the Ward's method with Euclidean distances was used to segregate groups based on the qPCR expression of the three genes. The independence between clinical parameters and the groups of patients was evaluated using Chi square or Fisher's exact test. Survival was estimated with the Kaplan-Meier method and survival curves were compared using the log-rank test. *P* values less than 0.05 were considered statistically significant. Overall survival (OS) was defined as time from MCL diagnosis to death as a result of any cause or date of last follow-up. The genetic analyses (SNP6.0 array and 17p/*TP53* alterations) were investigated either at or shortly (<5 months) following diagnosis in 45 of 53 MCL and before treatment in all of them. The impact of genetic analysis on survival was determined from the time of the sample assessment instead of time from MCL diagnosis.

2. Supplementary results

2.1 Design of a simplified 3-gene signature qPCR assay

In a previous study (Fernandez et al., 2010) using GEP we identified a gene signature of 13 genes highly expressed in conventional MCL and underexpressed in indolent MCL. In the present study, we developed a simple qPCR assay that could be useful to identify this signature without the need to perform a GEP analysis. First, we analyzed by qPCR the expression levels of seven genes of the signature (*SOX11*, *HDGFRP3*, *DBN1*, *HMGB3*, *PON2*, *CDK2API*, and *RNGTT*) in patients of the initial study, 7 with low and 10 with high expression levels of the signature. Similarly to the GEP analysis, (Fernandez et al., 2010) none of the genes individually could accurately identify all the cases. A combination of at least three genes performed better: all cases with the low GEP signature had very low expression of at least two of them. The three genes finally selected were *SOX11*, *HDGFRP3*, and *DBN1* based on the higher correlation coefficient ($R^2 > 0.82$) between their respective mRNA expression levels

detected by GEP and qPCR, and their higher specificity to identify MCL in comparison to leukemic non-MCL lymphomas (Supplementary Table S1, and Figures S1 and S2).

2.2 Sequential analysis of the 3-gene signature

We also analyzed leukemic samples of 9 MCL patients at two different time points of the disease, the 3 cases with high and the 6 cases with low expression signature at diagnosis maintained the high or low expression levels in the follow-up sample, in spite that the follow-up sample in 3 patients with low signature was from a progression of the disease, suggesting that this signature is a constitutional feature of MCL independent of the evolution of the disease.

Supplementary tables**Table S1.** Mean and standard deviation of the expression of *CCND1*, *SOX11*, *HDGFRP3* and *DBN1* genes and the 3-gene signature by quantitative PCR in leukemic samples.

	N	Mean-SD-(Range)
MCL samples (initial)		
<i>CCND1</i>	17	6.32-4.78-(0.53, 15.49)
<i>SOX11</i>	17	14.38-14.71-(0, 51.81)
<i>HDGFRP3</i>	17	0.91-1.03-(0, 3.59)
<i>DBN1</i>	17	0.78-0.88-(0.01, 2.97)
<i>High 3-gene signature*</i>	10	0.51-16.27-(-1.28, 3.3)
<i>Low 3-gene signature*</i>	7	-2.39-0.12-(-2.25, -2.5)
MCL samples (independent)		
<i>CCND1</i>	68	8.61-9.38-(0.44-61.86)
<i>SOX11</i>	68	29.13-32.30-(0, 130.8)
<i>HDGFRP3</i>	68	1.04-1.03-(0, 4.6)
<i>DBN1</i>	68	0.92-1.07-(0, 4.7)
<i>High 3-gene signature*</i>	46	1.27-2.22-(-1.97, 7.39)
<i>Low 3-gene signature*</i>	22	-2.65-0.12-(-2.77, -2.32)
Non-MCL samples		
<i>CCND1</i> †	39	0.07-0.17-(0, 0.9)
<i>SOX11</i>	42	0.07-0.3-(0, 1.99)
<i>HDGFRP3</i>	42	0.13-0.13-(0, 0.59)
<i>DBN1</i>	42	0.42-1.29-(0, 3.1)

Abbreviations: MCL, mantle cell lymphoma; N, number; SD, standard deviation

*A simplified 3-gene signature was calculated by summing the values of the three standardized genes. An unsupervised hierarchical clustering analysis of the 68 samples segregated two subgroups according to the high or low expression of the 3-gene signature. All cases with a high signature had values >-1.97 and cases with a low signature had values <-2.32 , thus we established the cut-off of -2 to distinguish both subgroups.

†*CCND1* levels could not be evaluated in 3 cases.

Table S2. Mutational status of *TP53* gene and clinical data in MCL patients with 17p alterations.

	Noda I	Interval* (Months)	Status	Outcome (Months)	N CNA	17p Status	Region	<i>TP53</i> Mutational Status	Exon	AA Mutation	CDS Mutation
hsMCL13	na	0	D	2	12	CNN-LOH	17pter-p11.2	mut	4	p.L111Q	c.332T>A
hsMCL25	yes	0	A	13	6	Del	17pter-p13.1†	wt	-	-	-
hsMCL32	yes	2	na	2.3	10	Del	17pter-p11.2	wt	-	-	-
hsMCL34	yes	1	D	8.7	5	CNN-LOH	17pter-p13.1	mut	8	p.V274G	c.821T>G
hsMCL36	yes	0	A	8.2	12	Del	17pter-q12	wt	-	-	-
hsMCL40	yes	26	D	57.7	23	Del	17pter-p13.3	mut	5	p.V173M	c.517G>A
hsMCL44	no	0	D	6	50	Del	17p13.1	mut	5	p.V173G	c.518T>G
hsMCL50	yes	15	D	93.8	15	Del	17pter-p13.1	mut	5	p.C176S	c.527G>C
hsMCL51	na	0	A	27.6	3	CNN-LOH	17p13.2-p13.1	wt	-	-	-
hsMCL52	yes	0	D	9.1	14	Del	17p†	mut	8	p.R306X	c.916C>T
lsMCL10	na	12	D	84	nd	Del‡	17p	nd	-	-	-
lsMCL18	yes	0	D	9.4	9	Del	17p	mut	5	p.H179R	c.536A>G
lsMCL19	no	0	A	14.7	7	Del	17p	mut	8	p.R282W	c.844C>T
lsMCL20	no§	35	A	44.7	14	Del	17pter-p11.2	mut	8	p.P301fs*43	c.903delA
lsMCL22	no	6	D	55	16	Del	17pter-p13.1	mut	7	p.R248Q	c.743G>A
lsMCL26	na	na	na	na	16	Del	17p	na	-	-	-
lsMCL29	na	na	na	na	7	Del	17p†	mut	5	p.Q144fs*26	430delC

Abbreviations: AA, amino acid; A, alive; CDS, coding sequence; CNA, copy number alterations; CNN-LOH, copy number neutral-loss of heterozygosity; Del, deletion; D, dead; hsMCL, high signature mantle cell lymphoma; lsMCL, low signature mantle cell lymphoma; mut, mutated; N, number, na, not available.

*Time between diagnosis and sample analyzed by SNP-array;

† Alteration present in subpopulation;

‡ Deletion of 17p detected by conventional cytogenetics: iso(17)q, no material available for SNP-array;

§ Patient with no lymphadenopathy at diagnostic but with nodal presentation at the moment of molecular analyses; || Deleterious mutations (non-functional protein) in IARC database, except in cases cMCL52, lsMCL20 and hsMCL29 which are not available.

Table S3. Significant parameters in log rank test for OS in MCL patients.

	<i>N</i> <i>(dead patients)</i>	<i>5-year OS (%)</i>	<i>95% CI</i>	<i>Log Rank P value</i>
3-gene-signature				
High	42 (23)	32	11-53	0.01
Low	17 (5)	75	48-100	
Nodal presentation				
Yes	32 (19)	36	13-59	0.03
No	22 (8)	59	31-87	
<i>IGVH</i> mutational status				
>97% homology	38 (19)	38	14-62	0.05
≤97% homology	17 (6)	60	28-92	
Number of CNA*				
CNA≥5	32 (17)	32	8-56	0.02
CNA<5	15 (2)	70	28-100	

Abbreviations: CI, confidence interval; CNA, copy number alterations; MCL, mantle cell lymphoma; N, number of cases; OS, overall survival.

* Survival for molecular analyses was calculated from the time of sample assessment instead of from the time of diagnosis.

Supplementary figures

Figure S1. Scatter plot of regression analysis for expression levels of *SOX11* (a) *HDGFRP3* (b) and *DBN1* (c) between gene expression profiling (GEP) and quantitative-PCR (qPCR) data in the 17 MCL cases of the initial series.

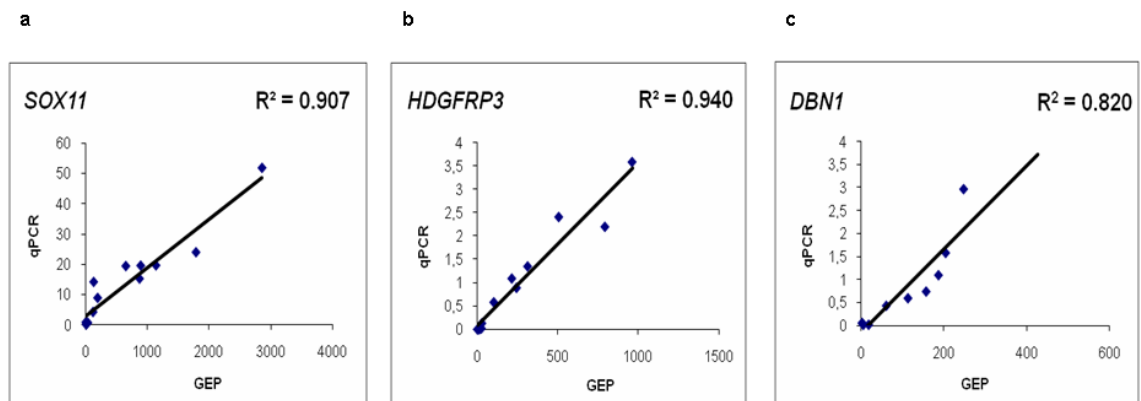


Figure S2. Box-plots of the relative expression of *CCND1* (a), *SOX11* (b), *HDGFRP3* (c), and *DBN1* (d) analyzed by qPCR in two series of leukemic MCL (initial set: 17 MCL and independent set: 68 MCL) and 42 leukemic non-MCL neoplasms. The four genes were significantly more expressed in MCL than in non-MCL samples (MCL independent set vs. non-MCL: $P < .001$, $< .001$, $< .001$, and $.03$ for *CCND1*, *SOX11*, *HDGFRP3*, and *DBN1* genes, respectively).

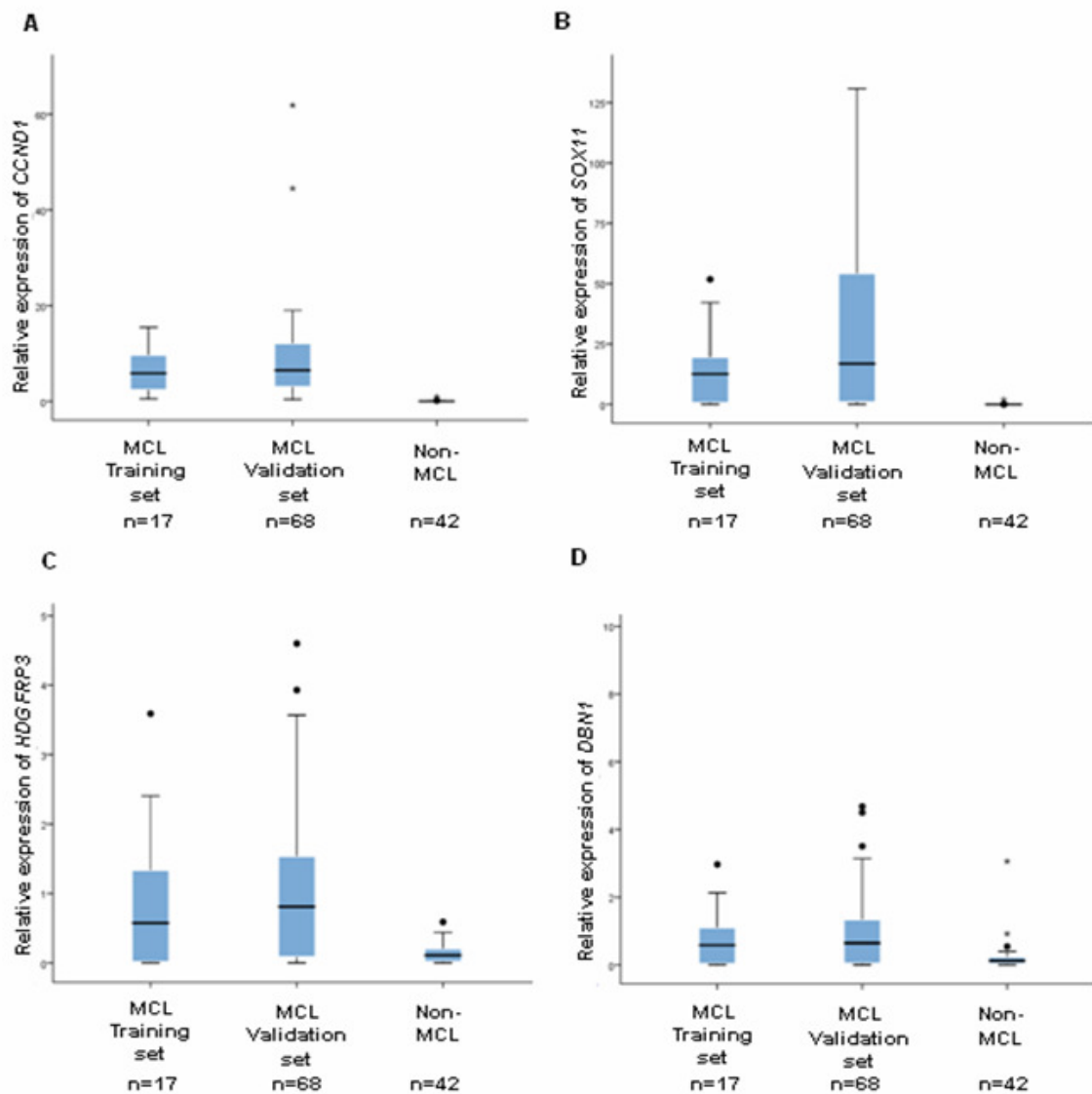


Figure S3. Unsupervised hierarchical clustering of 68 MCL based on the combination of the gene expression of *SOX11*, *HDGFRP3* and *DBN1* performed by quantitative PCR. Two subgroups of patients were segregated according to the high (hsMCL) or low (lsMCL) expression of the 3-gene signature. The relative mRNA expression levels are represented in a color scale, from green to red, indicating low to high expression, respectively.

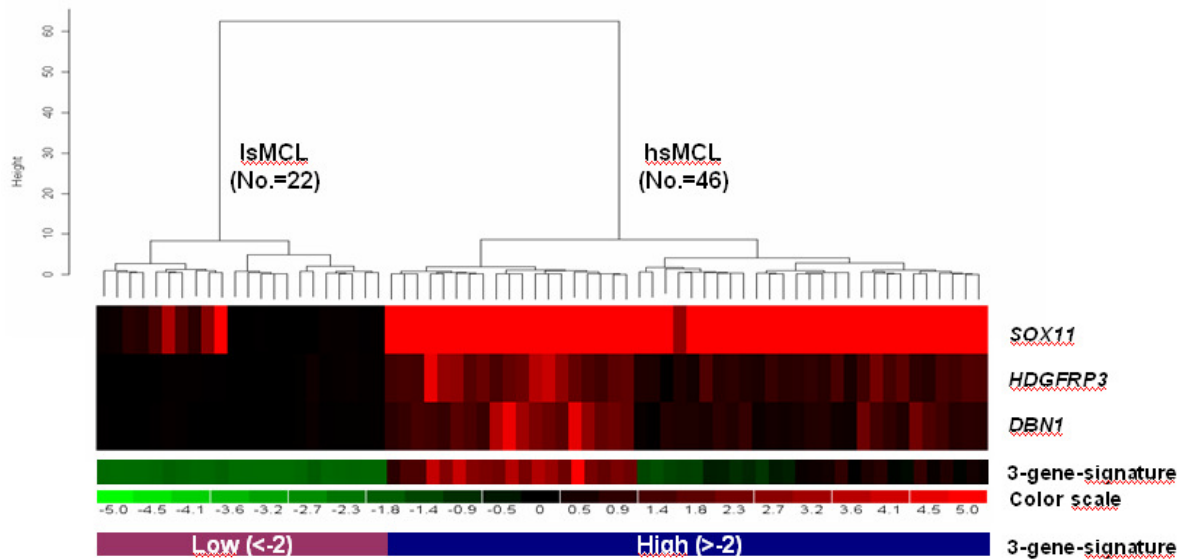


Figure S4. Expression levels of the 3-gene signature in MCL patients. Box-plot of the normalized 3-gene signature in the two subgroups of MCL. The cases in the low signature MCL (lsMCL) subgroup showed normalized values below -2 whereas the cases in the high signature MCL (hsMCL) subgroup showed levels above -2.

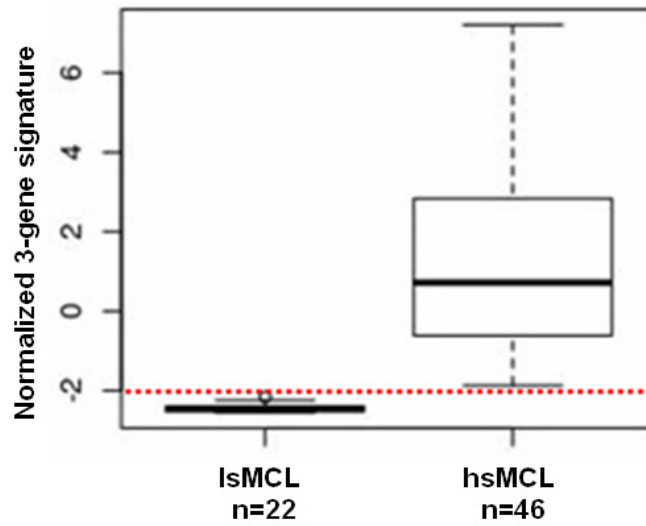


Figure S5. Secondary chromosomal alterations in MCL samples analyzed by SNP6.0 array. In the X-axis the chromosomes are represented horizontally from 1 to 22, in the Y-axis the percentage of cases showing the copy number alterations. Gains are represented in the positive Y-axis and colored in blue, whereas losses are represented in the negative Y-axis in red. Frequency plot of copy number alterations in MCL patients according to the high (hsMCL, n=36) (a) or low (lsMCL, n=17) (b) expression of the 3-gene signature. Significant differences between the two subgroups are highlighted with an asterisk.

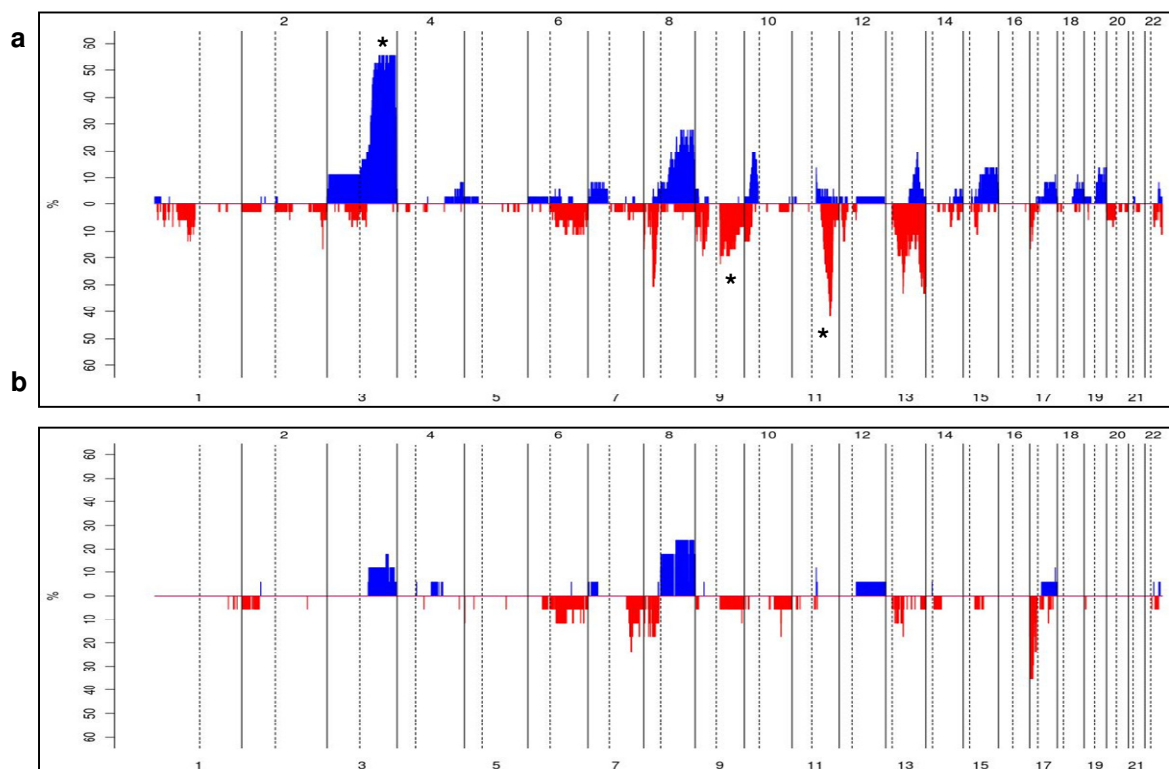
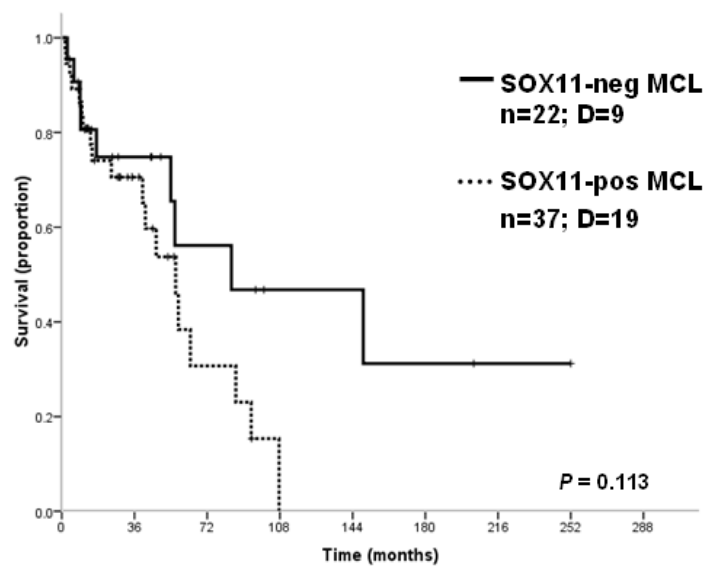


Figure S6. Kaplan-Meier estimates of overall survival for 59 MCL patients according to the high (SOX11-pos MCL, n=37) or low (SOX11-neg MCL, n=22) expression of the SOX11. The differences were not statistically significant. Using only SOX11 expression values instead of the combined 3-gene signature leads to the misclassification of 5 MCL patients, with relatively low *SOX11* (6.5-7.9) and high levels of both *HDGRFP3* and *DBN1* genes. Both the molecular (*IGHV* mutations, genomic complexity) and the clinical features of these five cases were more similar to cases with high 3-gene expression signature than cases with low signature.



Supplementary references

- (1) Fernandez V, Salameró O, Espinet B et al. Genomic and gene expression profiling defines indolent forms of mantle cell lymphoma. *Cancer Res.* 2010;70:1408-1418.
- (2) Hadzidimitriou A, Agathangelidis A, Darzentas N et al. Is there a role for antigen selection in mantle cell lymphoma? Immunogenetic support from a series of 807 cases. *Blood.* 2011.
- (3) van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia.* 2003;17:2257-2317.
- (4) Bea S, Salaverria I, Armengol L et al. Uniparental disomies, homozygous deletions, amplifications, and target genes in mantle cell lymphoma revealed by integrative high-resolution whole-genome profiling. *Blood.* 2009;113:3059-3069.

ARTICLE 3: Expressió de microRNAs, alteracions cromosòmiques i hipermutacions a la cadena pesada de les immunoglobulines en el limfoma de cèl·lules del mantell

Cancer Research. Setembre del 2009. 1;69(17):7071-8

Resum:

La contribució dels microRNAs (miR) en la patogènesis del limfoma de cèl·lules del mantell (LCM) no és massa coneguda. En aquest estudi investiguem l'expressió de 86 miRs madurs mapats en regions freqüentment alterades en LCM, en cèl·lules B normals CD5(+)/CD5(-), ganglis limfàtics reactius i cèl·lules tumorals purificades de 17 LCM leucèmics, 12 LCM ganglionars i 8 línies cel·lulars de LCM. Les alteracions genòmiques dels tumors són investigades per SNP arrays i hibridació genòmica comparada. Tants els tumors leucèmics com els ganglionars mostren un elevat nombre de miRs diferencialment expressats comparant amb cèl·lules B normals purificades, però alguns d'ells són comunament desregulats en ambdós tipus de tumors. Un anàlisi no supervisat del perfil d'expressió dels miRs de LCM leucèmics i purificats revela dos clústers de tumors caracteritzats per diferent estat mutacional del gens de les IG, la signatura de proliferació i el número d'alteracions genòmiques. L'expressió de la majoria dels miRs no esta relacionada amb canvis del número de còpia gènica en el seu locus cromosòmic respectiu. Només els nivells del miRs inclosos en el clúster de miR-17-92 estaven relacionats significativament amb les alteracions genètiques de 13q31. Per altra banda, la sobreexpressió del grup de miRs inclosos en miR17-5p/miR-20a es va associar amb elevats nivells d'mRNA de MYC en tumors amb un comportament més agressiu. En conclusió, el patró d'expressió de miRs en LCM està desregulat en comparació amb les cèl·lules limfoides normals i es distingeixen dos subgrups de tumors amb diferents característiques biològiques.

MicroRNA Expression, Chromosomal Alterations, and Immunoglobulin Variable Heavy Chain Hypermutations in Mantle Cell Lymphomas

Alba Navarro,¹ Sílvia Beà,¹ Verónica Fernández,¹ Miriam Prieto,¹ Itziar Salaverria,¹ Pedro Jares,¹ Elena Hartmann,⁵ Anna Mozos,¹ Armando López-Guillermo,² Neus Villamor,¹ Dolors Colomer,¹ Xavier Puig,³ German Ott,⁶ Francesc Solé,⁴ Sergi Serrano,⁴ Andreas Rosenwald,⁵ Elías Campo,¹ and Luis Hernández¹

Departments of ¹Pathology (Hematopathology Unit) and ²Hematology, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, University of Barcelona; ³Department of Statistics, Technical University of Catalonia; ⁴Department of Pathology, Hospital del Mar, Barcelona, Spain; ⁵Institute of Pathology, University of Würzburg, Würzburg, Germany; and ⁶Department of Clinical Pathology, Robert-Bosch-Krankenhaus, Stuttgart, Germany

Abstract

The contribution of *microRNAs* (*miR*) to the pathogenesis of mantle cell lymphoma (MCL) is not well known. We investigated the expression of 86 mature *miRs* mapped to frequently altered genomic regions in MCL in CD5⁺/CD5⁻ normal B cells, reactive lymph nodes, and purified tumor cells of 17 leukemic MCL, 12 nodal MCL, and 8 MCL cell lines. Genomic alterations of the tumors were studied by single nucleotide polymorphism arrays and comparative genomic hybridization. Leukemic and nodal tumors showed a high number of differentially expressed *miRs* compared with purified normal B cells, but only some of them were commonly deregulated in both tumor types. An unsupervised analysis of *miR* expression profile in purified leukemic MCL cells revealed two clusters of tumors characterized by different mutational status of the immunoglobulin genes, proliferation signature, and number of genomic alterations. The expression of most *miRs* was not related to copy number changes in their respective chromosomal loci. Only the levels of *miRs* included in the *miR-17-92* cluster were significantly related to genetic alterations at 13q31. Moreover, overexpression of *miR-17-5p/miR-20a* from this cluster was associated with high *MYC* mRNA levels in tumors with a more aggressive behavior. In conclusion, the *miR* expression pattern of MCL is deregulated in comparison with normal lymphoid cells and distinguishes two subgroups of tumors with different biological features. [Cancer Res 2009;69(17):7071–8]

Introduction

MicroRNAs (*miR*) are noncoding regulatory small RNAs generated from larger precursors with a hairpin-like structure (1, 2). These small RNAs bind to specific mRNA transcripts leading to their degradation and/or translational blocking (3, 4). Different studies have shown their contribution to the modulation of cellular processes such as differentiation, proliferation, and apoptosis that play an important role in oncogenesis (5, 6). *miRs* are located

throughout the genome and are often found in chromosomal loci altered in different neoplasms (7). Genomic alterations including gains/amplifications, losses, and translocations of these regions could be a causal event of *miR* deregulation in cancer (8, 9).

Mantle cell lymphoma (MCL) is genetically characterized by the t(11;14)(q13;q32) translocation resulting in rearrangement and overexpression of the *CCND1* gene (10). In addition to this primary genetic alteration, most MCL carry a high number of recurrent secondary gains and losses as well as uniparental disomies, homozygous deletions, and high-level DNA amplifications (11, 12). In a recent review of the potential genes that could be targeted by recurrent MCL chromosomal aberrations, we noticed the presence of a relatively high number of *miRs* in these regions (13). Interestingly, some of the *miRs* involved have been shown to modulate genes related to the regulation of cell cycle and survival pathways, two mechanisms that have an important role in the progression of MCL (14). However, the *miR* expression profile in MCL and their potential involvement in the pathogenesis of these tumors have not been examined previously.

To determine the role of *miR* deregulation in the pathogenesis of MCL, we have investigated the expression of a panel of *miRs* located in commonly altered chromosomal regions in a series of primary tumors and cell lines and their relationship to the clinicopathologic characteristics of the patients.

Materials and Methods

Case selection and cell lines. Peripheral blood samples from 17 patients with classic leukemic MCL and 50 nodal MCL, 36 classic and 14 blastoid variants, were obtained from the Department of Pathology of the Hospital Clínic and Hospital del Mar and Institute of Pathology of the University of Würzburg. The leukemic cases were selected based on the sample availability for tumor cell purification and the nodal cases based on the high content of tumor cells (>85%). Tumor cells were purified in leukemic samples as described previously (15). In addition, CD5⁺ and CD5⁻ fractions of normal B cells were obtained by cell sorting from equal cell amounts from four tonsil samples using FACS Vantage SE cell sorter (BD Biosciences) of the Cytomic Unit Facility of Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer and with antibodies against CD19-FITC (Beckman Coulter) and CD5-PE (BD Biosciences). Twelve reactive lymph nodes were pooled and used as an additional normal tissue sample for comparison with nodal MCL.

In two MCL patients, paired peripheral blood and tumor lymph node samples were available and the CD19⁺CD5⁺ tumor cells were purified from both. MCL-derived cell lines GRANTA519, RECI, JEKO1, UPN1, HBL2, MINO, MAVER1, and JVM2 were also studied and grown as described

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

Requests for reprints: Luis Hernández, Lab 302, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Facultat de Medicina, C/Casanova 135, 08036 Barcelona, Spain. Phone: 34-932275400, ext. 2129; Fax: 34-932275717; E-mail: heman@clinicub.es.

©2009 American Association for Cancer Research.

doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1095

Cancer Research

previously (16). EBV infection status of these cell lines has been described previously (17).

All MCL of the study were positive for cyclin D1 expression. Ki-67 proliferation antigen expression was studied by immunohistochemistry on formalin-fixed, paraffin-embedded material of nodal MCL cases (18). The gene expression profile of the leukemic MCL was examined previously using Affymetrix U133 Plus 2.0 microarrays and tumor proliferation signature was calculated according to Rosenwald and colleagues (19) as the normalized mean expression of the 20 genes included in this signature.⁷ The immunoglobulin variable heavy chain genes (*IgVH*) mutational status was studied as described previously (20). All patients gave informed consent and the whole study was previously approved by the Hospital Clínic of Barcelona Institutional Review Board.

miR selection. The complete list of the miRs analyzed is shown in Supplementary Table S1. This set was selected to cover the highest number of known miRs mapped at the most frequent chromosomal altered regions in MCL (21, 22) but limited by the presence of homologous mature forms in different genomic locations and the reagent availability (Applied Biosystems). A total of 85 miRs were finally included corresponding to 3 located at 11q13, 24 at 14q32, and 58 at loci involved in regions of chromosomal gains/amplifications or losses in MCL (11). Additionally, *miR-181a* was also included to explore its possible clinical relevance in MCL, because it had been characterized in chronic lymphocytic leukemia (CLL) as the most significant miR showing high levels associated with short time from diagnosis to initial therapy (23). This miR was excluded for the correlation analysis between the expression and genomic status because their two variants map to two different chromosomal loci (see Supplementary Table S1) and could not be differentiated in the expression analysis of the resulting mature miR variants.

RNA isolation and reverse transcriptase-looped quantitative PCR. Total RNA was isolated from all samples using Trizol reagent (Invitrogen). The mRNA levels of the mature miRs previously selected were investigated by reverse transcriptase-looped quantitative PCR as described previously (24). The CD5⁺/CD5⁻ normal B-cell samples were used as calibrators. As a normalization of RNA input, a noncoding RNA (RUI9/snoRA74A; Applied Biosystems) was selected by its location at 5q31.2, an infrequently altered region in MCL, and their low variation amplification values. miR quantifications in relative units were calculated with software package SDS 2.1 (Applied Biosystems) based on 2^{- $\Delta\Delta C_t$} method and converted to log₁₀ scale for more convenient data representation.

Reverse transcriptase-looped quantitative PCR of miR-17-5p and miR-20a was done in 38 additional nodal MCL samples. *MYC* mRNA expression in the 50 nodal MCL cases had been previously investigated by reverse transcriptase-looped quantitative PCR (25).

Genomic analysis: single nucleotide polymorphism arrays. The detection of DNA copy number changes and uniparental disomy was investigated in the cell lines and leukemic MCL using the GeneChip mapping 100K single nucleotide polymorphism array (Affymetrix) as described previously (11). The genomic profile of 12 of these MCL cases has been published previously (11), and 5 additional cases were investigated for the present study using the same protocol and criteria. The genomic alterations in the nonpurified nodal MCL samples had been previously analyzed using comparative genomic hybridization (21). miR genomic loci status was defined by their physical position on public databases overlapping with chromosomal regions defined as altered in the studied samples.

Statistical and bioinformatics analysis. Nonsupervised clustering analysis of miR expression data was done using an Euclidean-related metrics (Manhattan distance) and a complete clustering algorithm (TIGR MeV software package; ref. 26). The differential miR expression analysis between MCL groups was done using unpaired/paired significance analysis of microarrays (SAM) method as implemented in TIGR MeV software package (26), adjusting delta parameter to ensure the lowest false discovery rate ($q < 0.01$; refs. 27, 28). Differentially expressed miRs from MCL samples

compared with each of the considered controls were established using 95% confidence interval of the difference of means between samples and controls for each miR. In all comparisons, only miRs with detectable expression in >50% of the samples in each group were considered.

The correlation between miR loci copy number changes and their expression levels was analyzed using the Kendall τ -b statistic. Genomic alterations were divided into loss and gain/amplification. Only miR loci with alterations present in >15% of the cases were included in the analysis. Uniparental disomy was considered separately and analyzed using Kruskal-Wallis test. For statistical correction of multiple comparisons, *P* values were adjusted using the Benjamini and Hochberg false discovery rate method (ref. 29; R package).⁸ Adjusted *P* values < 0.05 were considered significant. Categorical data were compared using Fischer's exact test, and Mann-Whitney nonparametric test was used for comparisons of continuous variables.

The survival analysis was done using the Kaplan-Meier analysis, and survival curves were compared with the log-rank test (SPSS software 13.0) on the patients groups categorized by miR-17-5p/miR-20a and *MYC* expression levels. These groups were defined into high (above cutoff) or low (at or below cutoff), and given that no clear criteria of gene overexpression in tumors without increased gene dosage could be defined, expression cutoff was set at the 70th percentile expression. This cutoff was the highest to (a) maximize the number of patients in all the groups analyzed and (b) define a high expression group including patients with gain/amplification of these genes.

Results

miR expression profile in leukemic MCL. The expression of the selected miRs was initially investigated in leukemic and cell line MCL samples and compared with CD5⁺ and CD5⁻ B-cell pools. Leukemic MCL showed a miR expression profile different from both B-cell controls (Fig. 1A; Supplementary Table S2A-C), including 17 and 9 miRs, respectively, which were not detectable in these normal samples but were expressed in 12% to 100% of the tumors (Supplementary Table S2A). Significant differences were also detected in miRs with detectable expression in both B-cell controls and tumors. Thus, 17 miRs showed a higher mean fold change (MFC; 1.36-8.59), whereas 34 miRs were down-regulated in the tumors compared with CD5⁺ B cells (MFC, 0.61-0.02; Fig. 1A; Supplementary Table S2B). Similarly, 2 miRs had significantly higher levels in the tumors (MFC, 3.36-6.83), whereas 49 miRs were significantly down-regulated (MFC, 0.59-0.01) in the tumors compared with CD5⁻ B cells (Fig. 1A; Supplementary Table S2C).

The unsupervised hierarchical clustering analysis of the miR expression in tumor samples and cell lines showed three distinctive clusters corresponding to the cell lines and two groups of leukemic MCL. These three clusters were observed using either normal CD5⁺ or CD5⁻ B cells as reference calibrators (clusters A and B; Fig. 1A; Supplementary Fig. S1A).

To determine the significance of the two subgroups of MCL, we studied several clinical and biological characteristics of these tumors (Fig. 1A). Interestingly, the mutational status of the *IgVH* genes was significantly different in the two clusters of MCL. Thus, 7 of 9 tumors in the cluster B had a hypermutated *IgVH* gene (<95% homology), whereas 7 of 8 cases included in cluster A were found unmutated (>98% homology; $P = 0.012$, Fischer's exact test). The number of genomic alterations detected by the single nucleotide polymorphism array analysis was also significantly different between cluster A (mean, 6.5 ± 5.07) and cluster B (mean, 1.56 ± 2.35 ;

⁷ Fernández et al., unpublished data.

⁸ <http://cran.r-project.org>

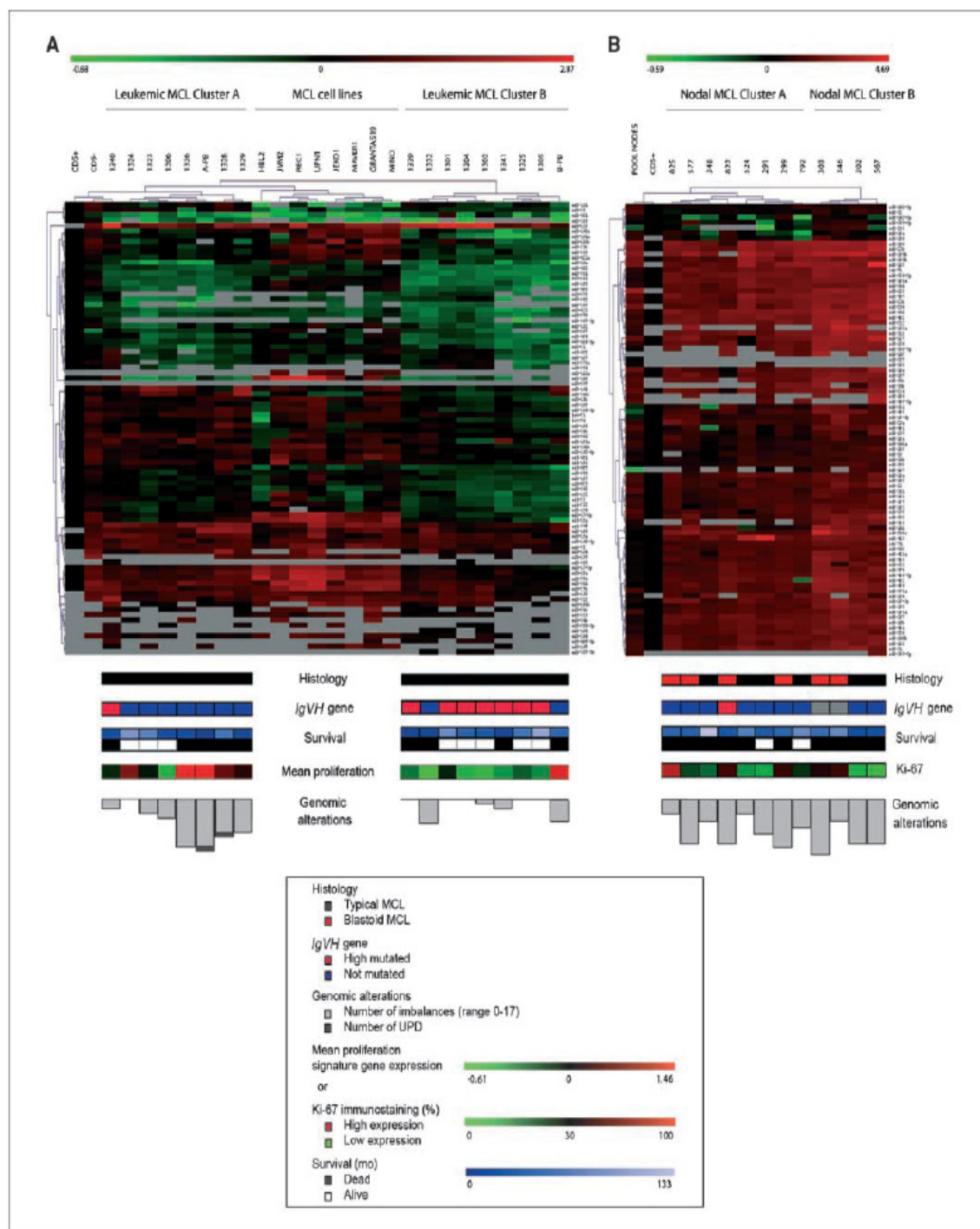


Figure 1. Heat map of miR expression in MCL samples determined by quantitative PCR relative quantification (log relative units). Gray boxes, undetectable expression. **A**, miR expression profile of purified tumor cells from peripheral blood in primary leukemic tumors, MCL cell lines, and two pools of normal tonsil CD5⁺ and CD5⁺CD19⁺ cells (calibrator). The unsupervised hierarchical clustering separates the samples in three subgroups corresponding to the cell lines and two distinct clusters of primary MCL (clusters A and B). The histologic variant, *IgVH* mutational status, survival, mean value of the proliferation signature, and number of chromosomal alterations of each primary MCL are shown below the corresponding miR profile. **B**, miR expression profile of a nonpurified nodal MCL series and an additional pool of reactive lymph nodes in reference to CD5⁺CD19⁺ cells (calibrator). The unsupervised hierarchical clustering analysis showed two main clusters. Additional data of these lymphomas are also shown below the corresponding miR profile. The proliferation index of the tumors was evaluated with Ki-67 immunostaining.

$P = 0.024$, Mann-Whitney test). In addition, the mean proliferation signature obtained from the microarray expression analysis of these tumors was also significantly higher in cluster A (mean, 0.17 ± 0.49) than in cluster B (mean, -0.15 ± 0.61 ; $P = 0.043$, Mann-Whitney

test; Supplementary Table S3). Although patients in cluster A show a shorter median overall survival (15 months) than cluster B patients (median overall survival not reached), the differences were not significant.

Cancer Research

Table 1. miR signature with significant differential expression between clusters A and B of leukemic MCL cases

miR	Cytoband	Score (d)*	Fold change
miR-181a	1q31/9q33	2.93	11.86
miR-200c	12p13	2.92	11.40
miR-497	17p13	2.97	9.74
miR-22	17p13	2.70	5.35
miR-345	14q32	2.37	4.95
miR-485-5p	14q32	2.01	4.76
miR-190	15q22	2.46	4.73
miR-15b	3q26	3.46	4.66
miR-324-3p	17p13	2.48	4.41
miR-132	17p13	2.17	4.07
miR-342	14q32	2.77	3.60
miR-148b	12q13	3.32	3.58
miR-17-5p	13q31	2.10	3.14
let-7d	9q22	2.89	3.07
miR-452	Xq28	2.50	3.05
miR-30d	8q24	2.83	2.85
miR-17-3p	13q31	2.08	2.84
miR-192	11q13	2.07	2.81
miR-186	1p31	2.45	2.70
miR-28	3q28	3.18	2.68
miR-423	17q11	2.31	2.67
miR-20a	13q31	2.54	2.58
miR-30b	8q24	2.86	2.54
miR-197	1p13	2.30	2.47
miR-23b	9q23	2.54	2.45
miR-15a	13q14	2.02	2.20
miR-491	9p21	2.06	2.03
miR-32	9q31	2.09	2.02

*SAM statistical score.

To determine the miRs differentially expressed between these two groups of MCL, we performed an unpaired SAM analysis. A group of 28 miRs, all with high SAM statistical scores (>2), showed a significant overexpression in cluster A compared with cluster B (MFC, 4.12; range, 2.02-11.86; Table 1). An additional supervised unpaired SAM analysis between *IgVH* mutational classes was done. A total of 29 miRs showed a significant overexpression in unmutated versus hypermutated *IgVH* MCL cases (MFC, 3.41; range, 1.57-16.26; Supplementary Table S4) and included 17 (61%) miRs of the differentially expressed miRs found between MCL clusters A and B.

The third cluster in the unsupervised analysis corresponded to the MCL cell lines. No significant differentially expressed miRs were found between EBV⁺ (GRANTA519 and JVM2) and the remaining EBV⁻ MCL cell lines. A SAM analysis comparing the expression profile of the cell lines and primary tumors revealed 29 miRs differentially expressed between these groups (Supplementary Table S5). Only 4 miRs were not detectable in the cell lines but were expressed in 12% to 65% of the tumors (Fig. 1A; Supplementary Table S24).

miR expression profile in nodal MCL. The expression miR profile was next examined in nodal MCL in reference also to CD5⁺/CD5⁻ B-cell pools. Nodal MCL samples showed a high number of differentially expressed miRs (Supplementary Tables S5A and B). Thus, 73 miRs were significantly overexpressed compared with CD5⁺

B cells (MFC, 3.18-1153.71). Similarly, 66 miRs were significantly overexpressed (MFC, 1.92-2052.29), but only 3 miRs were down-regulated (MFC, 0.29-0.12) in tumors compared with CD5⁻ B cells. In addition, the proportion of common deregulated miRs between nodal and leukemic MCL samples (marked with asterisks in Supplementary Tables S5A and B and S2B and C) was noticeable low in reference to either CD5⁺ B cells (20.6% overexpressed and 29.4% down-regulated miRs, respectively) or CD5⁻ B cells (7.4% overexpressed and 9.8% down-regulated miRs, respectively). Noticeably, miR-337 was detected in the pool of reactive lymph nodes but was not expressed in the CD5⁺/CD5⁻ normal B cells or any tumor sample.

Unsupervised hierarchical clustering analysis of the relative miR expression in the nodal tumors in reference to either normal CD5⁺/CD5⁻ B cells generated two miR signatures that separate 4 and 8 tumors (Fig. 1B; Supplementary Fig. S1B) but were not related to significant differences in histologic variants, Ki-67 proliferation index, *IgVH* mutational status, or genomic complexity of the tumors (Fig. 1B).

miR expression and microenvironment of tumor cells. The different pattern of miR expression in purified leukemic cells and nodal lymphomas prompted us to evaluate the possible influence of the nodal microenvironment on the miR expression profile. Thus, we were able to study purified (>98%) MCL cells from matched samples obtained simultaneously from leukemic and nodal samples in two patients (identified as A-PB/A-Node and B-PB/B-Node samples in Figs. 1A and 2). Most miRs were expressed at similar levels in both samples in the two patients. However, 11 miRs had a marked significant overexpression (3.6- to 21.9-fold change) in the nodal sample compared with the leukemic cells of both cases, suggesting that they may be modulated by influences of the tissue microenvironment (Fig. 2).

miR expression and genetic alterations. The t(11;14)(q13;q32) translocation is the primary genetic alteration in MCL (14). Several miRs have been mapped in the chromosomal subregions involved, including 7 miRs at 11q13 and 60 miRs at 14q32 (30). To determine whether this translocation may deregulate them, we have compared their expression in the cell lines and leukemic MCL with those

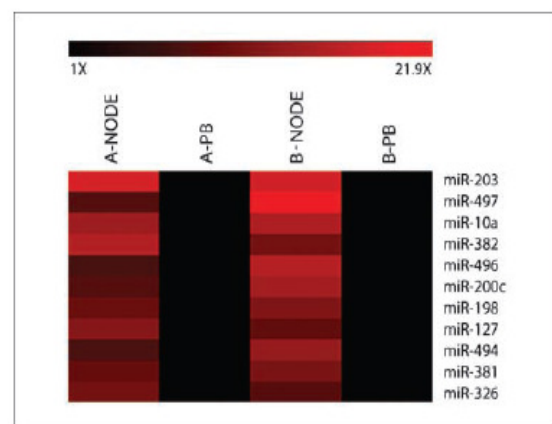


Figure 2. Heat map representation of the significant miR expression differences in paired samples of purified tumor cells from simultaneous matched peripheral blood (PB) and tumor lymph nodes (NODE) of two patients (A and B). Eleven miRs were found differentially expressed in the paired SAM analysis of expression levels between the two tumor cell populations from these two patients. Relative expression was obtained in reference to CD5⁺ control cells but, additionally for each miR, its expression in the nodal samples has been normalized in reference to the peripheral blood values for a more clear representation.

MicroRNAs in Mantle Cell Lymphoma

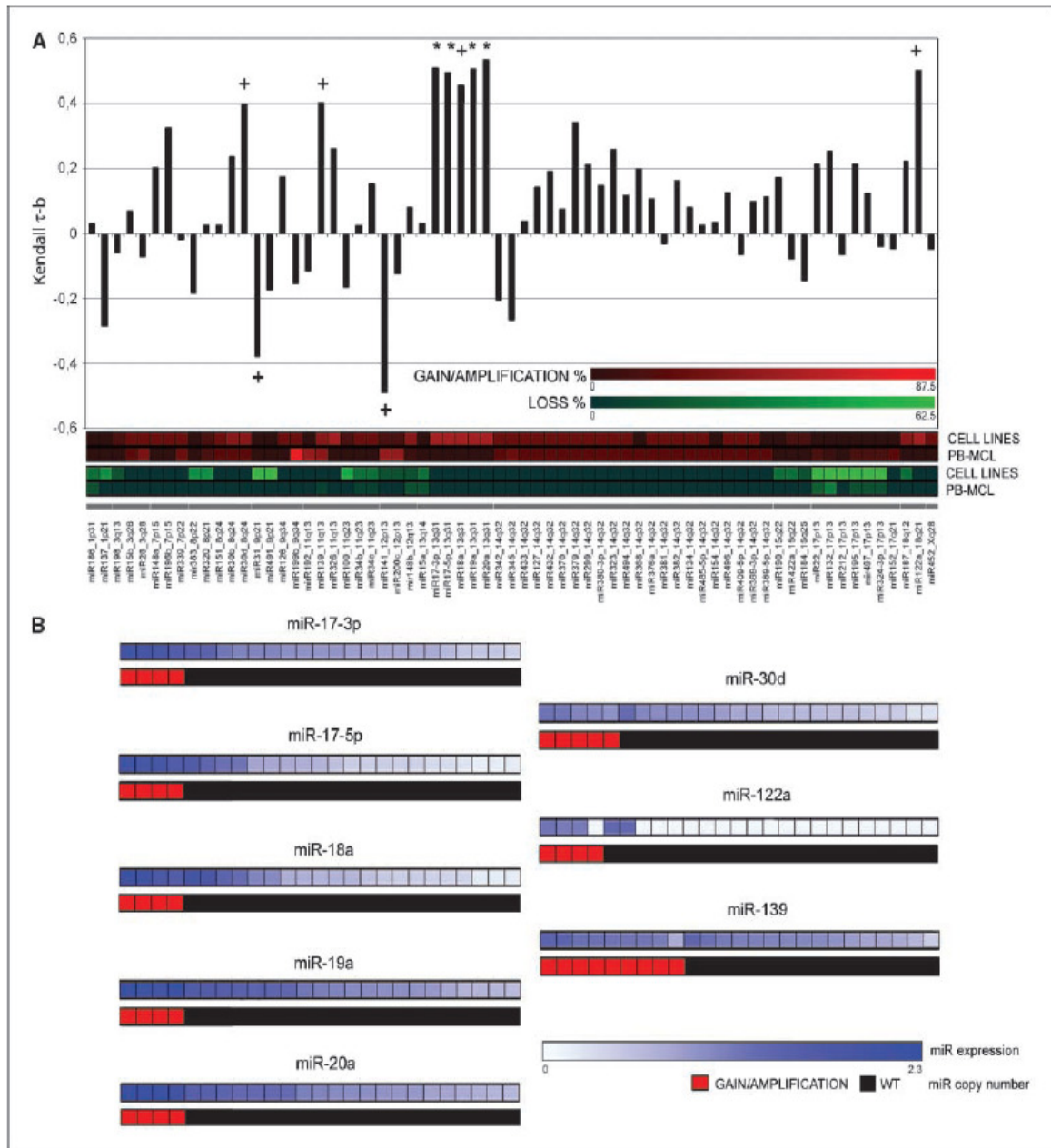


Figure 3. Correlation analysis of the *miR* locus copy number changes and expression levels in cell lines and leukemic MCL. **A**, representation of the correlation Kendall τ -b statistic results as a bar chart for each *miR* ordered by chromosomal physical position. Only *miR* loci with copy number alterations in >15% of cases were included. A few *miRs* (crosses) showed a statistical significant correlation ($P < 0.05$). *miRs* at 13q31 showed a significant correlation after correction for multiple comparison (asterisks; adjusted $P = 0.042$). The percentage of cases with gains/amplifications (red) and losses (green) in leukemic MCL (PB-MCL) and cell lines is represented as heat maps for each considered *miR*. **B**, heat map comparing the expression levels and gene copy number status for the *miRs* with a significant correlation between these two parameters. For each *miR*, cell line and leukemic MCL results are mixed. The different cases are grouped by presence (red) or absence (black) of genomic alteration of the *miR* locus, and inside these categories, *miR* expression levels are shown ordered decreasingly from left to right.

in the normal CD5⁺/CD5⁻ B cells. The analyzed *miRs* included 3 mapped at 11q13 (1 centromeric and 2 telomeric to the *CCND1* gene) and 24 at 14q32 (all centromeric to the *IgH* gene; Supplementary Fig. S2) covering several individual and polycistronic *miR* regions (31). These *miRs* had a highly variable expression among the MCL samples (range, 0.16-2.24 relative units). The 3 11q13 *miRs*

showed significant higher levels in MCL samples compared with CD5⁺ normal B cells but were down-regulated in reference to the CD5⁻ normal B cells irrespective of their location in the derivative chromosomes and thus suggesting an absence of *IgH* enhancer influence in their expression (Supplementary Fig. S2). The expression of most *miRs* located at 14q32 did not show significant

Cancer Research

differences between tumor samples and both subsets of normal B cells (Supplementary Fig. S2).

To determine the possible influence of DNA copy number changes in the expression of the mature *miRs*, we performed a correlation analysis between the *miR* expression levels in the cell lines and leukemic MCL and the genomic data of the respective chromosomal loci obtained in the single nucleotide polymorphism array study. A significant positive correlation between increased expression levels and high DNA copy number was found for the *miRs* located at 8q24 (*miR-30d*), 11q13 (*miR-139*), 13q31 (*miR-17-3p*, *miR-17-5p*, *miR-18*, *miR-19a*, and *miR-20a*), and 18q21 (*miR-122a*; Fig. 3; Supplementary Table S6). Interestingly, the relationship between expression levels and copy number changes of the 13q31 *miRs* was observed even after stringent adjustment for multiple testing (adjusted $P = 0.042$; Supplementary Table S6). The single nucleotide polymorphism array analysis detected also regions of partial uniparental disomy in all cell lines and 31% of the primary MCL. These uniparental disomies contained the genomic loci of 24% and 7% of the examined *miRs* in the cell lines and primary tumors, respectively. However, no significant association between the genetic alteration and the expression levels was observed, suggesting that the uniparental disomies do not deregulate the expression of the studied *miRs*.

To confirm the influence of copy number changes on *miR* expression in primary tumors, we expanded the study to the 12 nodal MCL in which a comparative genomic hybridization analysis had been done previously. These cases included 8 tumors with 13q31 genomic alterations (3 amplifications and 5 losses), 3 cases with 8q24 gains/amplifications, 2 tumors with gains of 11q13, and 1 case with 18q21 gain. A significant correlation was observed between the 13q31 copy number changes and the expression levels of the studied mature *miRs* of the *miR-17-92* cluster (Fig. 4; Supplementary Table S7). No other significant correlations were observed in this set of tumors.

***MYC* and 13q31 *miR* expression.** Experimental studies have shown that the *miR-17-92* cluster may cooperate with *MYC* in the development and progression of tumors (32). To determine whether the overexpression of these genes could influence the outcome of MCL patients, we analyzed the survival effect of the concomitant overexpression of *MYC* and *miR-17-5p* and/or *miR-20a* *miRs* in 50 patients with nodal MCL. Concomitant high levels of *MYC* and *miR-17-5p* or *MYC* and *miR-20a* were found in 8 patients who noticeably had a significant shorter overall survival (median overall survival, 17 months) than the 17 patients with high expression of *MYC* or *miR-17-5p/miR-20a* alone (median overall survival, 48 months) and the remaining 25 patients with low expression of all these genes (median overall survival, 69 months; $P = 0.025$, log-rank test; Fig. 5). The mean Ki-67 proliferation index in these three groups was 45.2 ± 30 , 38.9 ± 23.7 , and 29.8 ± 15.6 , respectively. Although the proliferation tended to be higher in the tumors with higher levels of *MYC* and *miR-17-5p/miR-20a*, the differences were not statistically significant ($P = 0.681$, Kruskal-Wallis test).

Discussion

In this study, we have examined the expression profile of 86 selected *miRs* in a series of leukemic and nodal MCL. The comparison of leukemic MCL *miR* expression profiles with normal CD5⁺/CD5⁻ B cells showed that the tumors had a profile different from both controls and included the up-regulation of several *miRs* that were not detected in these normal counterparts. Interestingly, the unsupervised hierarchical clustering analysis of highly purified leukemic MCL cells revealed two distinctive subsets of tumors showing significant differences in the *IgVH* mutational status, proliferation signature, and number of chromosomal alterations. Although the number of tumors in each group is limited, these findings suggested that these clusters may correspond to two subtypes of MCL with marked biological differences. Interestingly, previous studies have recognized a subtype of MCL characterized

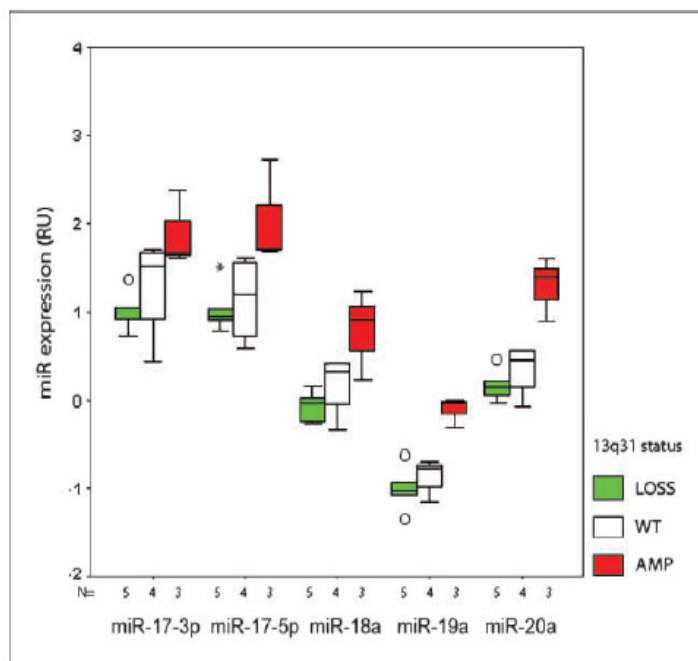
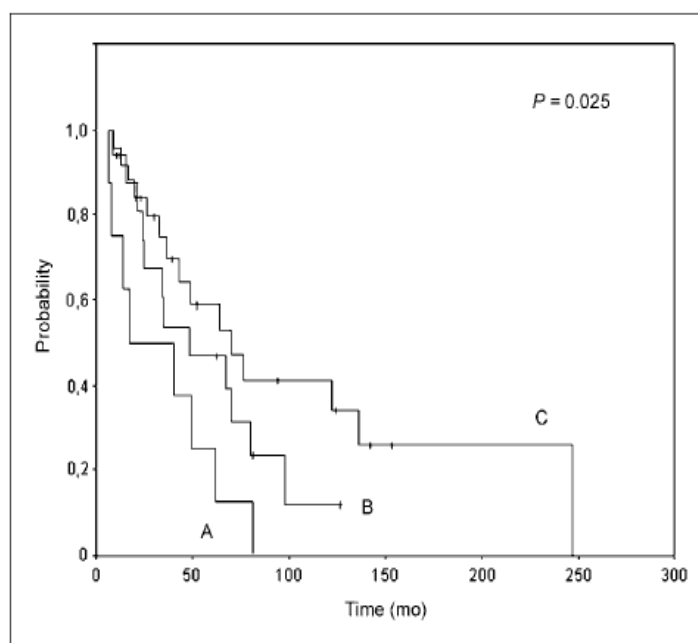


Figure 4. Box plot representing the relative expression levels [relative units (RU)] of the examined *miRs* at 13q31 and their copy number changes in nodal MCL. All 5 *miRs* showed a significant correlation between the expression levels quantified by reverse transcriptase–looped quantitative PCR and the gene dosage of this locus according to comparative genomic hybridization results [loss (LOSS), wild-type (WT), and amplification (AMP)]. Circles and asterisks, extreme values and outliers, respectively.

Figure 5. Overall survival of 50 patients with nodal MCL according to the combined expression of *MYC* and miR-17-5p/miR-20a. MCL patients with concomitant high expression of both *MYC* and miR-17-5p/miR-20a ($n = 8$; line A) have a significant shorter overall survival than patients with high expression of only one ($n = 17$; fail 5; line B) or none ($n = 25$; fail 10; line C) of these factors ($P = 0.025$, log-rank test).



by a predominant leukemic presentation, higher number of *IgVH* mutations, lower genetic complexity, and better outcome (33, 34). The two clusters of MCL with different miR expression profile identified in our study may correspond to this subtype and conventional MCL, respectively.

This relationship between miR expression and different tumor subsets may be reminiscent of the situation in CLL in which the miR profile distinguishes two tumor subgroups related to the *IgVH* mutational status (23, 35). miR-15a, miR-195, miR-23b, and miR-142-3p, described previously as *IgVH* mutation-related miRs in CLL (23, 36), were also included in the present study, but any of them showed a significant difference expression related to the *IgVH* mutation status in MCL. Interestingly, several up-regulated miRs in the unmutated *IgVH* subset of MCL tumors have been involved in tumor growth promotion, proliferation, and cell survival regulation. Thus, the highest differentially expressed miR in cluster A, miR-181a, has been associated with more aggressive clinical behavior in CLL and promotes tumor growth of multiple myeloma cells (23, 37, 38). miR-181a also controls negatively the p53 activity by interfering with p300-CBP-associated factor, an upstream regulator of p53 stability (37).

The causes of miR deregulation in tumors are not well known but may include gene dosage alterations or rearrangements close to miR loci (9, 39–41). In this study, we investigated a series of miRs mapped to chromosomal regions frequently altered in MCL (14). We found a significant correlation of the corresponding mature miR levels with the gene dosage alterations for several miRs located at 8q24 (*miR-30d*), 11q13 (*miR-139*), 13q31 (*miR-17-3p*, *miR-17-5p*, *miR-18*, *miR-19a*, and *miR-20a*), and 18q21 (*miR-122a*). Interestingly, this relationship for the mature miRs of the *miR-17-92* cluster was retained even after the stringent adjustment for multiple testing. In a recent study, we showed that the precursor gene of this cluster (*c13orf25*) was the only gene included in the minimal common amplified region at 13q31 in MCL and its expression levels were related to the gene copy number changes (11). Overexpression of 13q31 miRs associated with gene amplification

has been also observed in Burkitt's and diffuse large B-cell lymphomas, indicating that it may be an important mechanism in the pathogenesis of this group of aggressive lymphomas (42, 43).

The oncogenic role of the *miR-17-92* cluster has been shown previously and may involve several mechanisms including cooperation with *MYC* inducing a decreasing in apoptosis (32, 44–46). On the other hand, *MYC* overexpression has been recognized as a prognostic factor in MCL (25). To determine the potential cooperation of these two factors, we studied *MYC* and miR-17-5p/miR-20a expression in 50 nodal MCL. Our results showed that tumors with the concomitant highest levels of *MYC* and miR-17-5p/miR-20a had significant shorter overall survival than cases with high expression of only one or none of these factors. These results suggest that the cooperation in tumor progression observed in experimental studies may also occur in human MCL.

In this study, we observed marked differences in the expression levels of several miRs between leukemic and nodal MCL. Although nodal MCL were selected by high tumor content, these differences may be due in part to contamination with other nonneoplastic cell types. Nevertheless, miR-337 expression was not detected in any leukemic MCL or nodal MCL in spite of being detected in the pool of reactive nodal tissues, suggesting that the degree of cell contamination of the nodal MCL was not enough to allow the detection of this miR. To determine whether these differences could be due to the different topographic location of the tumor, we were able to purify tumor cells from simultaneous peripheral blood and lymph node sample in two patients. Interestingly, we detected 11 miRs that had a marked significant overexpression in the nodal sample compared with the leukemic cells in both cases, suggesting that they may be modulated by influences of the tissue microenvironment. The idea that miR expression may be regulated in different cell compartments is also supported by a recent study of miR expression in CLL in which the expression of BIC/pri-miR-155 was higher in cells of the proliferation growth centers, whereas miR-150 was mainly expressed by surrounding resting CLL cells (47).

Cancer Research

In summary, our results show that the miR expression profile in MCL is deregulated in comparison with normal lymphoid cells and distinguishes two subgroups of tumors that differ in the mutational status of the *IgVH* genes, genomic complexity and proliferation. The deregulation of some miRs is related to gene copy number changes, whereas others seem to be modulated by microenvironment influences. The concomitant high expression of *MYC* and miR-17-5p/miR-20a from the *miR-17-92* cluster seems to be associated with tumors with a more aggressive behavior.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

Received 3/24/09; revised 6/10/09; accepted 6/30/09; published OnlineFirst 8/18/09.
Grant support: Instituto de Salud Carlos III grants FIS 01/3046 and FIS 05/050224 (L. Hemández), Ministerio de Ciencia e Innovación grant SAF 08/03630, Instituto de Salud Carlos III-RETIC 2006RET2039 (E. Campo), RETICS RD07/0020/2004, and Interdisciplinary Center for Clinical Research of the University of Würzburg (A. Rosenwald and E. Hartmann). L. Hemández is a researcher from Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer and is supported by FIS and "programa d'estabilització d'investigadors" of Direcció d'Estratègia i Coordinació del Departament de Salut (Generalitat de Catalunya).

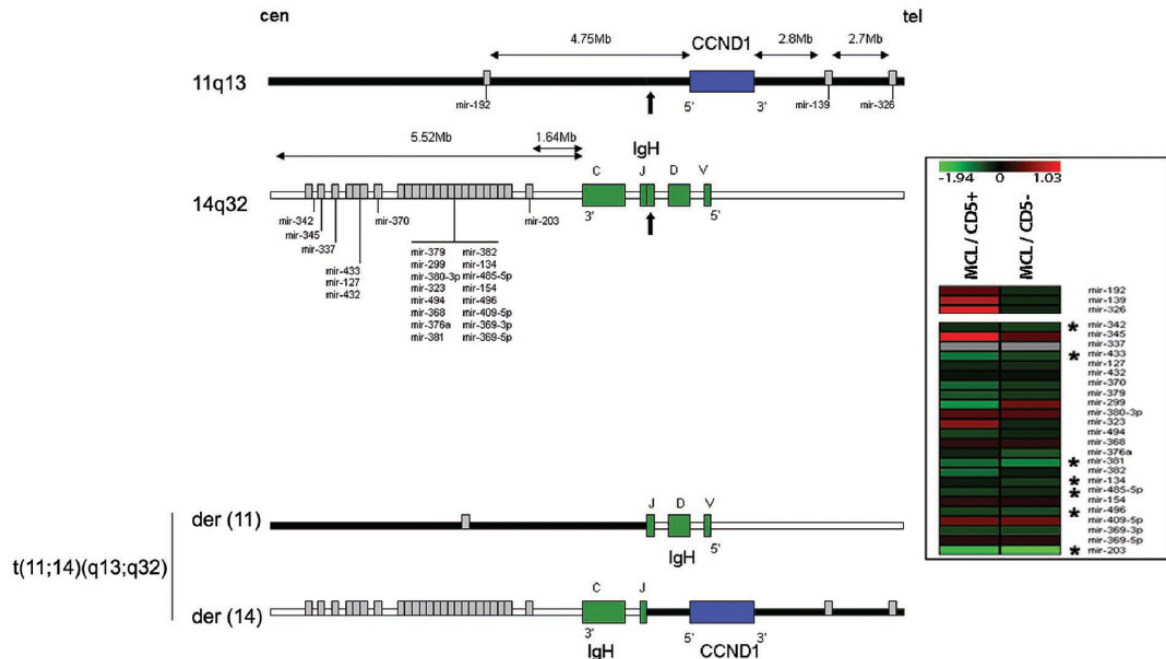
The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

We thank the Tumor Bank of the Department of Pathology of the Hospital Clínic of the University of Barcelona and the Xarxa de Bancs de tumors de Catalunya for providing normal lymph node samples.

References

- Mendes Soares LM, Valcarcel J. The expanding transcriptome: the genome as the 'Book of Sand'. *EMBO J* 2006;25:923-31.
- Zeng Y. Principles of micro-RNA production and maturation. *Oncogene* 2006;25:6156-62.
- Engels BM, Hubvagner G. Principles and effects of microRNA-mediated post-transcriptional gene regulation. *Oncogene* 2006;25:6163-9.
- Lim LP, Lau NC, Garrett-Engle P, et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 2005;433:769-73.
- Miska EA. How microRNAs control cell division, differentiation and death. *Curr Opin Genet Dev* 2005;15:563-8.
- Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs—microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6:259-69.
- Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:2999-3004.
- Huppi K, Volfosky N, Mackiewicz M, et al. MicroRNAs and genomic instability. *Semin Cancer Biol* 2007;17:65-73.
- Calin GA, Croce CM. MicroRNAs and chromosomal abnormalities in cancer cells. *Oncogene* 2006;25:6202-10.
- Bosch F, Jares P, Campo E, et al. PRAD-1/cyclin D1 gene overexpression in chronic lymphoproliferative disorders: a highly specific marker of mantle cell lymphoma. *Blood* 1994;84:2726-32.
- Bea S, Salaverria I, Armengol I, et al. Uniparental disomies, homozygous deletions, amplifications and target genes in mantle cell lymphoma revealed by integrative high-resolution whole genome profiling. *Blood* 2009;113:3059-69.
- Kohlhammer H, Schwaenen C, Wessendorf S, et al. Genomic DNA-chip hybridization in t(11;14)-positive mantle cell lymphomas shows a high frequency of aberrations and allows a refined characterization of consensus regions. *Blood* 2004;104:795-801.
- Jares P, Campo E. Advances in the understanding of mantle cell lymphoma. *Br J Haematol* 2008;142:149-65.
- Jares P, Colomer D, Campo E. Genetic and molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: perspectives for new targeted therapeutics. *Nat Rev Cancer* 2007;7:750-62.
- Fernandez V, Jares P, Salaverria I, et al. Gene expression profile and genomic changes in disease progression of early-stage chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2008;93:132-6.
- Camps J, Salaverria I, Garcia MJ, et al. Genomic imbalances and patterns of karyotypic variability in mantle-cell lymphoma cell lines. *Leuk Res* 2006;30:923-34.
- Salaverria I, Perez-Galan P, Colomer D, Campo E. Mantle cell lymphoma: from pathology and molecular pathogenesis to new therapeutic perspectives. *Haematologica* 2006;91:11-6.
- Hernandez L, Bea S, Pinyol M, et al. CDK4 and MDM2 gene alterations mainly occur in highly proliferative and aggressive mantle cell lymphomas with wild-type INK4a/ARF locus. *Cancer Res* 2005;65:2199-206.
- Rosenwald A, Wright G, Wiestner A, et al. The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma. *Cancer Cell* 2003;3:185-97.
- van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-98-3936. *Leukemia* 2003;17:2257-317.
- Bea S, Ribas M, Hernandez JM, et al. Increased number of chromosomal imbalances and high-level DNA amplifications in mantle cell lymphoma are associated with blastoid variants. *Blood* 1999;93:4365-74.
- Salaverria I, Zettl A, Bea S, et al. Specific secondary genetic alterations in mantle cell lymphoma provide prognostic information independent of the gene expression-based proliferation signature. *J Clin Oncol* 2007;25:1216-22.
- Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005;353:1793-801.
- Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2005;33:e179.
- Hartmann E, Fernandez V, Moreno V, et al. Five-gene model to predict survival in mantle-cell lymphoma using frozen or formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *J Clin Oncol* 2008;26:4966-72.
- Saeed AI, Sharov V, White J, et al. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* 2003;34:374-8.
- Chang SS, Jiang WW, Smith I, et al. MicroRNA alterations in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2008;123:2791-7.
- Garzon R, Volinia S, Liu CG, et al. MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood* 2008;111:3183-9.
- Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc B* 1995;57:289-300.
- Karolchik D, Kuhn RM, Baertsch R, et al. The UCSC Genome Browser Database: 2008 update. *Nucleic Acids Res* 2008;36:D773-9.
- Stamatopoulos K, Kosmas C, Belessi C, et al. Molecular analysis of bcl-1/IgH junctional sequences in mantle cell lymphoma: potential mechanism of the t(11;14) chromosomal translocation. *Br J Haematol* 1999;105:190-7.
- He L, Thomson JM, Hemann MT, et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 2005;435:828-33.
- Orchard J, Garand R, Davis Z, et al. A subset of t(11;14) lymphoma with mantle cell features displays mutated IgVH genes and includes patients with good prognosis, nonnodal disease. *Blood* 2003;101:4975-81.
- Rubio-Moscardo F, Climent J, Siebert R, et al. Mantle-cell lymphoma genotypes identified with CGH to BAC microarrays define a leukemic subgroup of disease and predict patient outcome. *Blood* 2005;105:4445-54.
- Calin GA, Liu CG, Sevignani C, et al. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:11755-60.
- Marton S, Garcia MR, Robello C, et al. Small RNAs analysis in CLL reveals a deregulation of miRNA expression and novel miRNA candidates of putative relevance in CLL pathogenesis. *Leukemia* 2008;22:330-8.
- Linares LK, Kiernan R, Triboulet R, et al. Intrinsic ubiquitination activity of PCAF controls the stability of the oncoprotein Hdm2. *Nat Cell Biol* 2007;9:331-8.
- Pichiorri F, Suh SS, Ladetto M, et al. MicroRNAs regulate critical genes associated with multiple myeloma pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:12885-90.
- Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:15524-9.
- Lamy P, Andersen CI, Dyrskjot L, Tørring N, Orntoft T, Wiuf C. Are microRNAs located in genomic regions associated with cancer? *Br J Cancer* 2006;95:1415-8.
- Zhang L, Huang J, Yang N, et al. MicroRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:9136-41.
- Ota A, Tagawa H, Karnan S, et al. Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-32 amplification in malignant lymphoma. *Cancer Res* 2004;64:3087-95.
- Tagawa H, Seto M. A microRNA cluster as a target of genomic amplification in malignant lymphoma. *Leukemia* 2005;19:2013-6.
- Matsubara H, Takeuchi T, Nishikawa E, et al. Apoptosis induction by antisense oligonucleotides against miR-17-5p and miR-20a in lung cancers over-expressing miR-17-92. *Oncogene* 2007;26:6099-105.
- Tagawa H, Kanube K, Tsuzuki S, Ohshima K, Seto M. Synergistic action of the microRNA-17 polycistron and Myc in aggressive cancer development. *Cancer Sci* 2007;98:1482-90.
- Coller HA, Forman JJ, Legesse-Miller A. 'Myc'ed messages': myc induces transcription of E2F1 while inhibiting its translation via a microRNA polycistron. *PLoS Genet* 2007;3:e146.
- Wang M, Tan LP, Dijkstra MK, et al. miRNA analysis in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: proliferation centres characterized by low miR-150 and high BIC/miR-155 expression. *J Pathol* 2008;215:13-20.

Supplementary figure 2



Supplementary Figure S2. Representation of the chromosomal regions involved in the t(11;14)(q13;q32) and the relative location of the studied *miR*s in reference to *CCND1* and *IgH* genes. The location of the *miR* examined at chromosome 11q and 14q are represented. The more frequent breakpoints are indicated with an arrow. The derivative chromosomes are depicted at the bottom. The box represents the mean expression values of the studied *miR*s at 11q13 and 14q32 in MCL samples in reference to CD5+ and CD5- controls without the t(11;14) translocation. Asterisks highlight the miRNAs with concordant significant differences in their expression in MCL samples compared to the normal controls.

REVISIÓ 1: Patogènesi en el limfoma de cèl·lules del mantell: Noves perspectives i nous desafiaments amb implicacions clíniques

Seminars in Hematology. Juliol del 2011, 48(3):155-65

Resum:

El limfoma de cèl·lules del mantell (LCM) és una neoplàsia de cèl·lules B genèticament caracteritzada per la translocació t(11;14)(q13;q32) que condueix a la sobreexpressió del seu gen diana *CCND1*. El comportament clínic agressiu d'aquest tumor ha estat considerat influenciat per la seva patogènesi genètica i molecular, que integra una acumulació de moltes alteracions cromosòmiques associades a freqüents alteracions del cicle cel·lular i mecanismes de resposta al dany al DNA, així com a l'activació de vies de supervivència. Estudis recents van encaminats a definir noves regions cromosòmiques, gens dianes i vies de senyalització que poden contribuir a la patogènesi d'aquest tumor. Existeix un subgrup de pacients que presenten una malaltia leucèmica, no ganglionar i amb un curs clínic més indolent que sembla tenir diferències en els seus perfils cromosòmics i genètics, comparant amb els LCM convencionals. Els nous estudis estan obrint noves perspectives en la patogènesi d'aquest limfoma, que podrien influir a la pràctica clínica diària, tant en el diagnòstic com en el tractament dels pacients.

Molecular Pathogenesis of Mantle Cell Lymphoma: New Perspectives and Challenges With Clinical Implications

Alba Navarro, Cristina Royo, Luis Hernández, Pedro Jares, and Elías Campo

Mantle cell lymphoma (MCL) is a B-cell neoplasia genetically characterized by the t(11;14)(q13;q32) translocation leading to the overexpression of its target gene *CCND1*. The aggressive clinical behavior of this tumor has been considered to be influenced by its genetic and molecular pathogenesis that integrates an accumulation of many chromosomal aberrations associated with frequent alterations in cell cycle and DNA damage response mechanisms and activation of cell survival pathways. Recent studies aimed to define new chromosomal regions, target genes, and signaling pathways that may contribute to the pathogenesis of this tumor. A subset of patients presenting with a leukemic and non-nodal disease and following a more indolent clinical evolution seem to have some differences in their chromosomal and genomic profiles compared to patients with conventional MCL. The new studies are opening new perspectives on the pathogenesis of this lymphoma that may influence our clinical practice in the diagnosis and management of patients. *Semin Hematol* 48:155-165. © 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

Mantle cell lymphoma (MCL) is a B-cell neoplasia clinically characterized by an aggressive behavior with poor response to conventional therapies and short median survival.¹ The recognition of the t(11;14) translocation and its target *CCND1* as the genetic and molecular hallmarks of this lymphoma was instrumental in obtaining a more precise definition of the disease and the characterization of the broad spectrum of pathological and clinical manifestations. Genetic and molecular studies have revealed that the pathogenesis of this lymphoma integrates mechanisms of cell cycle deregulation, alterations in the DNA damage response, and activation of cell survival pathways.^{1,2} This knowledge provides the framework for the expansion of new therapeutic strategies targeted to the basic mechanisms of the disease with very promising results. In the last years, recent studies have opened

new perspectives on the ontogeny and pathogenesis of this lymphoma that challenge some of our previous concepts about the disease. In this review we will examine the more recent advances in pathogenesis and how they may influence our clinical practice in the diagnosis and management of MCL patients.

INITIAL ONCOGENIC STEPS AND CELL OF ORIGIN

The t(11;14)(q13;q32) is considered the primary oncogenic event in MCL. This translocation juxtaposes the *CCND1* gene on 11q13 to the *IGH* gene on chromosome 14 leading to the overexpression of cyclin D1 that is not usually expressed in normal B cells. This translocation occurs at the pre-B stage of differentiation during the recombination of the V(D)J segments of the *IGH* gene in the bone marrow.³ Although the initial oncogenic translocation is acquired in an immature B cell, the tumor is composed of mature B lymphocytes that tend to grow in the mantle zones of the follicles and also express a phenotype similar to some subset of B cells in this location.¹ The expression of IgD and CD5 and the predominance of unmutated *IGHV* genes observed in early studies suggested that the normal counterpart of this tumor was a naïve B cell. However, recent studies have shown that 15% to 40% of MCLs carry *IGHV* somatic hypermutations and have a strong bias in the *IGHV* gene repertoire with *IGHV3-21*, *IGHV4-34*, *IGHV1-8*, and *IGHV3-23* used by 46% of

Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Suñyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Barcelona, Spain.

Supported by Spanish Ministry of Science and Innovation SAF 2008-03630, Instituto de Salud Carlos III "Red Temática de Investigación Cooperativa de Cáncer" (2006RET2039), Instituto de Salud Carlos III "Beca Predoctoral de Formación en Investigación en Salud" (FI08/00437) and Ministry of Science and Innovation "Formación de Personal Investigador" (BES-2007-16330).

Address correspondence to Elías Campo, MD, Hospital Clínic de Barcelona, Villarroel 170, 08036-Barcelona, Spain. E-mail: ecampo@clinic.ub.es

0037-1963/\$ - see front matter

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

doi:10.1053/j.seminhematol.2011.04.001

the cases.^{4,5} These aspects suggest that at least a subgroup of MCL is not derived from naïve B cells but from clonal expansions of antigen-driven B cells. This idea is further supported by the recognition of a bias association of certain *IGHV*, *IGHD*, and *IGHJ* genes with restricted VH CDR3 motifs in 10% of tumors. This scenario is similar to the stereotyped *IG* rearrangements observed in chronic lymphocytic leukemia (CLL). However, the family usage and clusters of the rearranged *IG* are different in the two diseases suggesting that the potential mechanisms involved in the clonal selection may be different. On the other hand, contrary to CLL no clear evidences of a relationship between the *IGHV* mutational status using a 2% cut-off and ZAP70 expression or prognosis has been observed in MCL.^{3,4,6,7} The number of *IGHV* mutations in most MCL is low, with only 14% of the tumors carrying more than 3% of somatic mutations, suggesting that the cell of origin in most of the tumors may not have experienced a strong influence of the somatic mutation machinery of the germinal center.⁵ Interestingly, Kolar et al have identified a mature B cell called "pro-germinal center cell" considered as an intermediate step between both naïve and germinal center cells characterized by the expression of IgD⁺CD38⁺CD23⁺CD71⁺, activation-induced cytidine deaminase (AID), and a low number of *IGHV* somatic mutations.⁸ These cells may be the normal counterparts of at least a number of MCLs. The relatively high number of somatic mutations observed in 14% of the cases suggested they may be derived from cells with a stronger germinal center experience.

CYCLIN D1 OVEREXPRESSION: CELL CYCLE Deregulation AND BEYOND

The t(11,14)(q13,q32) translocation is virtually present in all MCL and deregulates constitutively cyclin D1. The main form of cyclin D1 expressed in these tumors is a 36-kd polypeptide (isoform a) encoded by two main transcripts of 4.5 and 1.5 kb with different length of the 3' untranslated region (UTR). The shorter transcript lacks the terminal 3'UTR that contains AU-rich elements involved in transcript instability and binding sites for different miRs (*miR-16*, *miR-503*, *miR-15a*, *miR-34a*, *miR-195*, *miR-424*) that negatively regulate cyclin D1 expression.^{9,10} Some MCLs lack the long mRNA transcript but overexpress shorter cyclin D1 transcripts missing part of the 3'UTR. These anomalous transcripts are generated by secondary 3' rearrangement in the *CCND1* locus, or by genomic deletions and point mutations in the 3'UTR.¹¹ They are more stable than the normal longer transcript and correlate with higher cyclin D1 protein levels.¹¹⁻¹³ The *CCND1* gene also codifies for a less abundant polypeptide (isoform b) due to an alternative splicing that skips the last exon.¹⁴ Although the shorter cyclin D1b isoform has an

increased oncogenic capacity, its implication in MCL pathogenesis is not clear, since MCL cells mainly express the canonical cyclin D1a protein.¹⁵

Cyclin D1 has an important regulatory role of the cell cycle G1-S phase transition by binding to CDK4/6 kinases and phosphorylating RB1 that in turn releases the sequestered E2F transcription factors. In addition to the kinase activity, cyclin D1/CDK4 complexes may bind CDK inhibitors of the Cip/Kip family such as p27. This titration releases the inhibitory effect of p27 on CDK2/cyclinE complexes that complete the phosphorylation of RB1 and the subsequent progression of the G1-S phase (Figure 1). In spite of this key regulatory function of cyclin D1 in the cell cycle, its forced downregulation in MCL cell lines has shown a moderate effect in proliferation and survival of the tumor cells, partially due to the compensatory upregulation of cyclin D2 and the presence of secondary genetic events, that make cyclin D1 dispensable.¹⁶ These findings raise some doubts about the potential value of cyclin D1 as a target for therapy in this lymphoma.

Recent observations are expanding the views on the potential oncogenic effect of cyclin D1 beyond its role in cell cycle deregulation. In that sense, cyclin D1 may participate in the modulation of several transcription factors and coregulators and may also interact physically and recruit onto DNA chromatin-remodeling and histone-modifying enzymes.¹⁷ A recent report has also implicated cyclin D1 in DNA damage response mechanisms.¹⁸ However, the potential role of these alternative functions of cyclin D1 in MCL is not known (Figure 1).

CYCLIN D1-NEGATIVE MANTLE CELL LYMPHOMA

The detection of cyclin D1 overexpression due to the t(11;14) translocation in MCL is a hallmark for the diagnosis of this entity. However, a small subset of tumors with the morphology and phenotype of conventional MCL are negative for cyclin D1 expression and the t(11,14) translocation. Although the number of cases studied is still limited, the global gene expression profile and the portrait of secondary genetic alterations of these tumors are undistinguishable from those observed in cyclin D1-positive MCL, suggesting that they correspond to the same entity.^{19,20} Some cyclin D1-negative MCLs express high levels of cyclin D2 or D3 associated with chromosomal translocations fusing these genes with *IG* genes.^{19,21-23} However, other lymphomas also express these cyclins at lower levels, but the differences are not easily detected by immunohistochemistry, hampering the use of cyclin D2 and D3 to recognize cyclin D1-negative MCL.²⁴ The search for new biomarkers to identify cyclin D1-negative MCL has led to the identification of SOX11 as a reliable tool to diagnose these tumors in the clinical practice (Figure

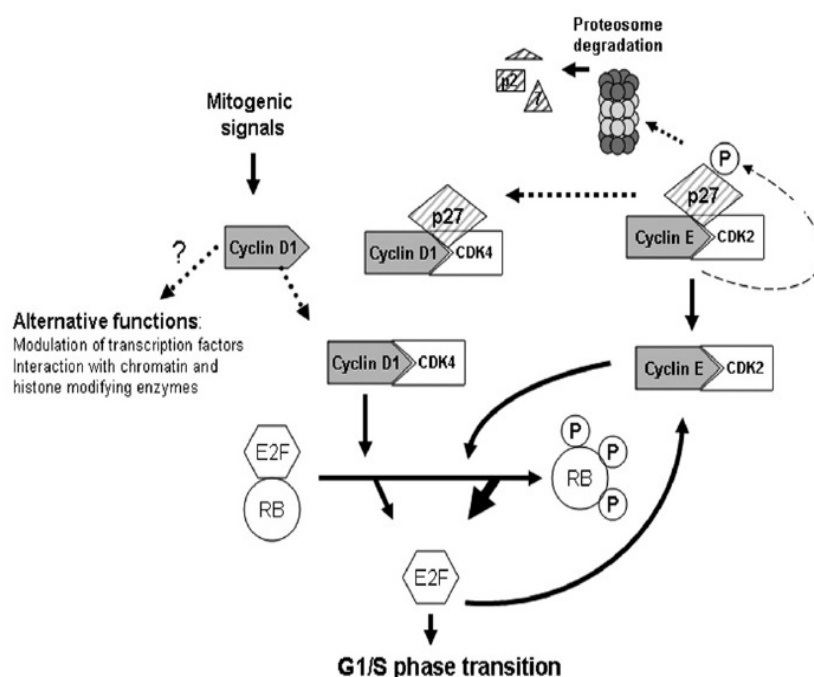


Figure 1. Role of cyclin D1 in the cell cycle. Cyclin D1, induced by mitogenic signals, binds to CDK4 and controls the G1/S phase transition by initiating the hyperphosphorylation of RB1 and the release of E2F. This initial activation of E2F would initiate the accumulation of cyclin E. In addition, the titration of p27 into cyclin D1/CDK4 complexes will promote the activation of cyclin E/CDK2 complexes that, in turn, will enhance p27 degradation and further phosphorylation of RB1, allowing the cell to progress into S phase. New evidence suggests that cyclin D1 might have cell cycle-independent functions.

2).²⁴ SOX11 is a neuronal transcriptional factor apparently not expressed in any hematopoietic cell lineage but highly expressed in more than 90% of MCLs. Interestingly, it is not expressed in other lymphoid neoplasms except for some Burkitt and lymphoblastic lymphomas at lower levels.²⁴⁻²⁷

FROM EARLY STEPS TO OVERT LYMPHOMA, A LONG LATENCY PERIOD

The oncogenic steps from the early event to the development of an overt lymphoma are not well known and may involve the acquisition of secondary

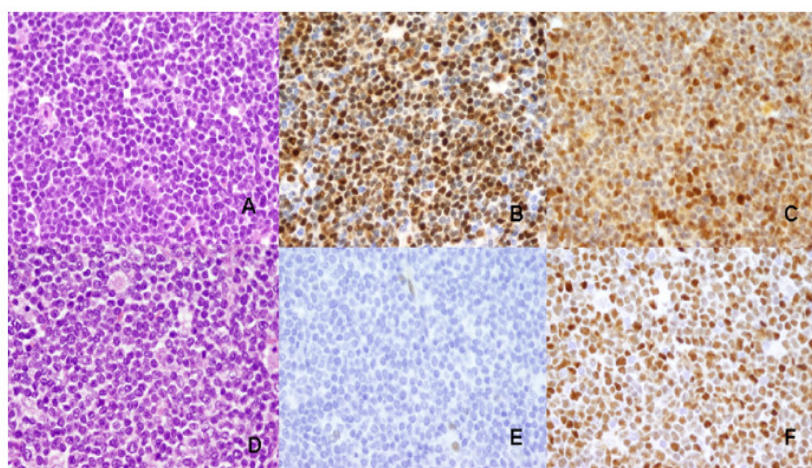


Figure 2. SOX11 expression in two MCL cases. (A) Conventional classical MCL (hematoxylin and eosin). (B) Cyclin D1 is positive in this tumor and (C) SOX11 is also positive. (D) Cyclin D1-negative MCL (hematoxylin and eosin) (E) Cyclin D1 is negative in this tumor, but (F) SOX11 is positive with a nuclear staining pattern.

genetic alterations and activation of additional pathways that facilitate the progression of the malignant clones. Interestingly, recent observations have suggested that this process may have a long latency and probably not all cells acquiring the initial translocation will evolve into a malignant lymphoma. Cells carrying the t(11;14) translocation have been described at very low levels in the peripheral blood of healthy individuals. These clones can persist over a long period of time (7–9 years) and even expand.²⁸ However, the relative high frequency (8%) of its detection in healthy individuals compared with the low incidence of MCL in the population suggests that not all these clones will progress to a malignant neoplasm. The observation of a simultaneous MCL with the same clonal origin in the recipient and donor 12 years after an allogenic bone marrow transplantation highlights the long latency period required by the initial clones to develop an overt lymphoma.²⁹ Similarly, a retrospective study in seven patients with MCL identified an “in situ” MCL in previous tissue biopsies obtained between 2.1 and 15.5 years before the development of a clinical MCL, confirming the idea of a long latency period from initial steps to the development of a clinical symptomatic disease.³⁰

SECONDARY GENETIC ALTERATIONS

Compared to other lymphomas, a high number of MCLs (93%) are genetically altered and have a high number of genomic aberrations per tumor.^{20,31} The initial cytogenetics and metaphase comparative genomic hybridization (CGH) studies identified a complex profile of secondary chromosomal alterations involving recurrent gains in 3q, 6p, 7p, 8q, 10p13, 12q, and 18q, as well as losses of 1p, 6q, 8p, 9p, 9q, 10p14–p15, 11q14–q23, and 13q.^{20,32} Regions involving gains of 3q, 7p, and 12q, and losses of 17p are significantly more frequent in blastoid and pleomorphic than in classical variants.³² Recurrent regions related to poor survival are gains of 3q and losses of 8p, 9p, and 9q.^{32–35} Genomic complexity reflected by an increased number of chromosomal imbalances (three or more) have been associated with shorter overall survival.^{20,32}

Recurrent translocations other than the t(11;14) are uncommon in MCL but several recurrent chromosomal breakpoints have been identified, the most frequent being at 1p22 and 8p1.³⁴ A few MCL have amplification or breaks at 5p13 involving the *TERT/CLPTMIL* region. None of them showed juxtaposition to any of the 3 *IG* loci, but had high *TERT* mRNA expression and telomerase activity.³⁶

The analysis of primary MCL with higher resolution platforms like array CGH^{33,35,37–39} and single-nucleotide polymorphism microarrays (SNP-chip)^{40–44} combined with microarray gene expression profiling (GEP) have revealed new altered regions and have narrowed

down some of the minimal regions involved in chromosomal alterations revealing novel candidate loci in MCL (Figure 3).

These integrative studies have identified recurrent homozygous deletions with relatively few potential target genes. In addition to the well-known 9p21.3, including *CDKN2A*, *CDKN2B*, and *MTAP*, other regions are 1p32.3/33 (*FAF1*, *CDKN2C*), 2q13 (*BCL2L11*), and 2q37 (*SP100*). Although these biallelic losses have been found in a limited number of primary MCLs, they are associated with a dramatic poor prognosis of the patients.^{42,44} Monoallelic deletions also seem to target relevant genes that may contribute to the pathogenesis of the disease. In addition to 17p and 11q deletions targeting *TP53* and *ATM*, respectively, other allelic deletions associated with mutated genes in the remaining allele have been recently identified including 13q14.2 and *RBI*⁴⁵ and 6q23.3–q24.1 associated with inactivating mutations or hypermethylation of the promoter of the NF- κ B pathway inhibitor *TNFAIP3/A20*.⁴⁶ The monoallelic losses of 1q32, 13q33–34, and 13q34 target *PROX1*, *ING1*, and *CUL4A*, respectively, and are associated with low expression of these genes.⁴⁴

The new integrative studies have also identified genes targeted by high-level DNA amplifications associated with mRNA overexpression.^{36,40,42–44,47} Interestingly, one of these regions is the translocated 11q13 that dramatically increases the cyclin D1 mRNA levels.⁴² The *MIR17HG* encoding the *mir-17-92* cluster has been identified as the target of the frequent amplified 13q31.3 region in MCL⁴⁷ and *BCL2* is the highest expressed gene within the 18q21.33 amplicon.⁴² The 3q26 region is frequently gained and sometimes amplified in MCL, but the potential target genes have not been clearly identified. The *PIK3CA* gene in this region encodes for the catalytic subunit of PI3K and its amplification correlates with overexpression and activation of the AKT pathway.⁴⁸

The SNP array studies have allowed the identification of copy number neutral loss of heterozygosity (CNN-LOH). These alterations may represent an alternative mechanism to chromosomal deletions for the inactivation of tumor-suppressor genes.⁴⁹ Consistent with this view, CNN-LOH in MCL occurs at chromosomal regions that are otherwise hit by genomic losses, such as the, 9p, 9q, 11q, 13q, and 17p. In that sense, the CNN-LOH at 17p13.1 is one of the most common and it has been associated with *TP53* mutations.^{41,42,44}

Copy number variants (CNV) and segmental duplication (SD) are structural variations that have recently been recognized in the human genome sequence.⁵⁰ These structural variations may facilitate the instability of the region and contribute to genomic variability and potentially to disease susceptibility.⁵¹ Interestingly, the breakpoints flanking all the genomic alterations, including deletions, amplifications, and CNN-LOH, in MCL are

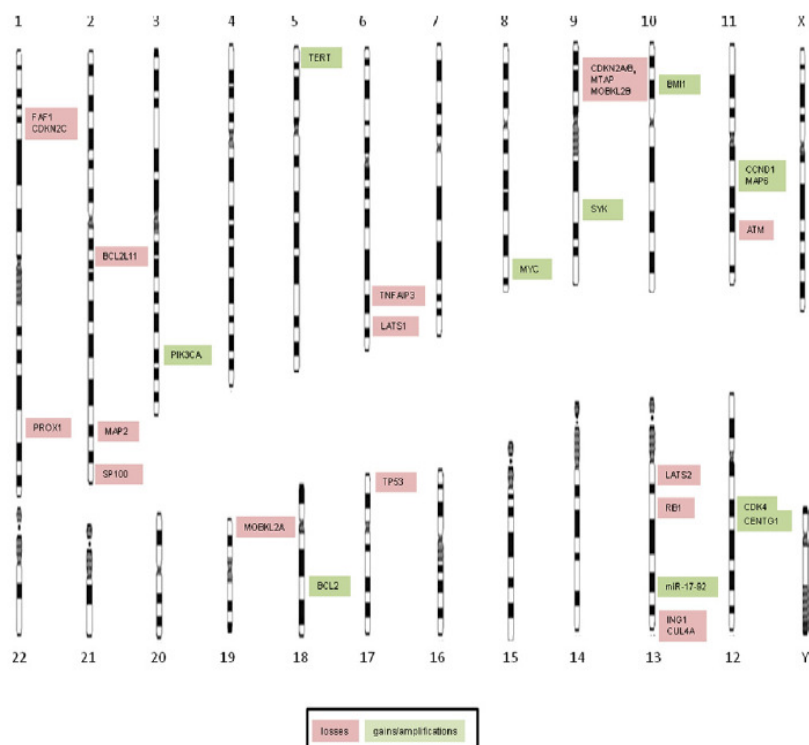


Figure 3. Idiogram showing the commonly genetic targets of the recurrent altered regions (losses and gains/amplifications) in MCL.

significantly enriched in SD and CNV (15% and 46%, respectively).⁴²

PATHOGENETIC PATHWAYS TARGETED BY GENETIC ALTERATIONS

Most genes targeted by recurrent chromosome abnormalities in MCL are elements of the cell cycle control, DNA damage and repair response, and cell survival pathways.^{1,2} Interestingly, the refinement of the new genetic studies is expanding the number of genes involved in these mechanisms but is also revealing the potential implication of new pathways such as the Hippo signaling pathway⁴⁴ and the network of microtubule-associated proteins.⁴¹

The fact that a G1 cyclin is the target oncogene of the t(11;14)(q13;q32) translocation highlights the relevance of cell cycle deregulation in MCL lymphomagenesis. This initial oncogenic event is followed by alterations in two major pathways, the *INK4a/CDK4/RB1* and *ARF/MDM2/TP53*. The *CDKN2A* locus (9p21), frequently deleted in MCL, encodes two essential cell cycle regulatory elements, INK4a, a member of the INK4 family of CDK inhibitors, and the positive p53 regulator *ARF*. This configuration determines the central role of the *CDKN2A* locus in tumor suppression connecting the RB and p53 pathway. *CDK4* is amplified and overexpressed in some highly proliferative

blastoid variants mainly with wild-type *CDKN2A*. The amplification and overexpression of the polycomb gene *BMI1* at 10p12.2 may be an alternative mechanism to inactivate this pathway since *BMI1* is a transcriptional repressor of the *CDKN2A* locus. *CDKN2B* (9p21) and *CDKN2C* (1p32.3), two other members of the INK4 family, are also silenced by biallelic deletions in some cases. Inactivating mutations of *RB1* have been described in tumors with a wild-type *CDKN2A* locus.⁴⁵ Interestingly, among the genes targeted by the recently reported 13q33-34 deletion is *CUL4A*, which appears to be implicated in the epigenetic activation of the *CDKN2A* locus.^{44,52} *CUL4A* expression is also repressed by cyclin D1.¹⁷ This effect correlates with the overexpression of the licensing factor *CDT1* and, in a context of *TP53* mutation, with the accumulation of chromosome abnormalities.^{17,53} This observation is consistent with the previous reported relationship of high cyclin D1 levels and the deregulation of DNA replication licensing genes in MCL with *TP53/ARF* inactivation.⁴⁵

The deletion of the *CDKN2A* locus also affects *ARF*, which is responsible for the stabilization of p53 by preventing its degradation by *MDM2*. An alternative mechanism for the inactivation of p53 is the amplification and overexpression of *MDM2* (12q13). In addition, one of the most strongly downregulated genes in cases with 13q33-34 deletion is *ING1*, a component of the

p53 signaling pathway.⁴⁴ The inactivating mutations of *TP53* occur in tumors with a wild-type *CDKN2A* locus but are frequently associated with *CDK4* amplification or *RB1* deletions, suggesting that MCL cells may have a selective advantage by inactivating simultaneously both *ARF/MDM2/TP53* and *INK4a/CDK4/RB1* pathways.^{45,54} Consistent with the importance of the cell cycle deregulation in MCL pathogenesis, a gene expression microarray signature that might integrate most of the above described genetic alterations has emerged as the best survival predictor in MCL.¹³

The high number of chromosomal aberrations identified in MCL and the frequent tetraploidization underline the relevance of the DNA damage response pathway in MCL lymphomagenesis.^{1,2} Thus, the *ATM*, a master regulator of this pathway located at 11q22-23, is frequently deleted and mutated in MCL and this inactivation correlates with increasing genomic instability.⁵⁵ Additional downstream elements such as *CHK1* and *CHK2* are also occasionally inactivated in MCL. Recently, *MCPH1*, also a regulator of this pathway,⁵⁶ has been identified as the potential target of the frequent 8p23 loss in these lymphomas.⁴⁴

Elements of cell survival pathways are also targeted by recurrent genetic alterations in MCL. Thus, some tumors carry amplifications and overexpression of *BCL2* (18q21) and its levels may predict the resistance to specific therapeutic inhibitory agents.^{42,57} Homozygous deletions of the proapoptotic *BCL2L1* at 2q13 have been found in some cases associated with very short survival of the patients.⁴⁴ Other genetic alterations seem to inactivate some inhibitors of the NF- κ B pathway such as the recurrent 1p32.3 deletion including *FAFI*⁴⁴ or the inactivating mutations of *TNFAIP3/A20* associated with allelic deletions of 6p23.⁴⁶

The Hippo signaling pathway was initially discovered in *Drosophila* as a regulator of body and organ size by inhibiting cell proliferation and promoting apoptosis. Recent evidence suggests that it also plays a role in cancer development with some of its elements acting as oncogenes or tumor-suppressor genes.⁴⁴ Interestingly, around 40% of MCLs have deletions and downregulation of *MOBK12B*, *MOBK12A*, and *LATS1*, three genes of this pathway located at 9p, 19p, and 6q24/25, respectively, and these alterations are associated with high proliferation, high genomic complexity, and shorter survival,⁴⁴ connecting for the first time this pathway to lymphomagenesis.

Different genes encoding microtubule-associated proteins (MAPs), such as *MAP2* (2q34) and *MAP6* (11q13.4-q13.5), have recently been identified as targets of chromosomal aberrations in MCL. The family of MAPs includes oncogenes, tumor-suppressor genes, and apoptosis regulators.⁵⁸ In this sense, the recent identification of *MAP6* amplification and *MAP2* deletion or partial methylation in MCL provide evidences

that alterations in microtubule dynamics may contribute to the karyotype complexity and chromosomal instability of these tumors.⁴¹ Supporting this hypothesis, high expression of centrosome-associated genes has been identified in tetraploid blastoid variants of MCL.⁵⁹

PATHWAYS CONSTITUTIVELY ACTIVATED IN MCL WITHOUT APPARENT GENETIC ALTERATIONS

Several signaling pathways implicated in cell growth and survival regulation are constitutively activated in MCL, although the primary mechanisms triggering this activation are not well elucidated (Figure 4). Understanding the deregulation of these pathways is increasingly relevant because new drugs targeting different elements are being developed with promising results in the clinics.

PI3K/AKT/mTOR

The *PI3K/AKT/mTOR* pathway connects cell membrane signals, including BCR in B lymphocytes, to cell proliferation, growth, and survival mechanisms. Gene expression profiling studies have identified the upregulation of several genes of this signaling pathway in MCL.⁶⁰ The tumor cells also express high levels of the phosphorylated active forms of several key components including AKT, mTOR, and respective downstream targets.⁶¹⁻⁶³ The initial mechanisms implicated in the constitutive activation of this pathway remain elusive. The upstream kinase SYK and the PI3K catalytic subunit α (*PIK3CA*) are amplified and overexpressed in a subset of cases.^{40,48} Although no genetic or epigenetic alterations of *PTEN*, a negative PI3K regulator, have been identified, loss of expression or its inactivation by phosphorylation have been found in some cases and might result in the constitutive activation of AKT.⁶¹ The relevance of this pathway in MCL is highlighted by the in vitro effects on cell cycle and survival of PI3K and mTOR inhibitors and the clinical responses obtained with the mTOR inhibitor temsirolimus in relapsed MCL patients.^{1,64,65}

WNT Pathway

The deregulation of the WNT canonical pathway plays an important role in the pathogenesis of a variety of human cancers. Early microarray studies in primary MCL identified the upregulation of several genes of this pathway.⁶⁰ Functional studies also suggest that WNT signaling is activated in MCL. MCL cells have inactive phosphorylated GSK3B, a key component of the destruction complex responsible of β -catenin inactivation,^{62,66} that correlates with nuclear accumulation of β -catenin, higher levels of cyclin D1, and shorter overall survival. The relevance of the canonical WNT path-

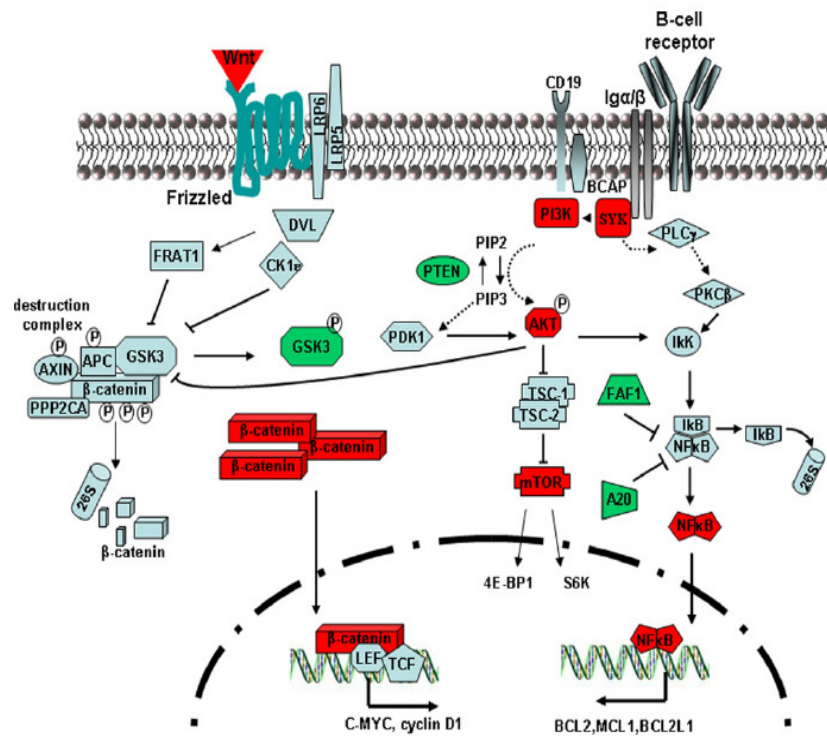


Figure 4. A schematic view of pathways constitutively activated in MCL without clear genetic alterations. MCL cells show activation of *PI3K/AKT/mTOR*, *WNT*, and *NF-κB* pathways resulting in cell cycle progression and resistance to apoptosis. The genes of the different pathways that have been described as constitutively activated in MCL cells are represented in red, and genes inactivated or downregulated are represented in green, independent of the knowledge of the genetic alterations responsible for the deregulation.

way in the pathogenesis of MCL is supported by the inhibition of proliferation and induction of apoptosis by the treatment with quercetin, a β -catenin drug inhibitor, or by the knockdown of upstream elements of the pathway.^{66,67}

NF-κB Pathway

Constitutive activation of NF-κB has been detected in MCL cell lines and primary MCL tumors with overexpression of several target genes, including the anti-apoptotic proteins cFLIP, BCL-2, BCL-X_L, and XIAP.⁶⁴ The mechanisms activating this pathway are not clear, but BCR and TNF signaling may be mediators of this activation and the microenvironment.⁶⁴ The recent identification of inactivating mutations, deletions, and promoter hypermethylation in two inhibitors of this pathway, *A20* and *FAF1*, highlight the genetic basis in the activation of NF-κB in MCL.^{42,46} Although preclinical studies have shown the potential value of several inhibitors of this pathway, its translation into the clinics seems more difficult.⁶⁴

MicroRNAs in MCL

MicroRNA (miR) deregulation has been described in MCL related to the status of the *IGHV* gene and degree

of genomic complexity.^{47,68,69} Although, the expression of these miRs seem to be independent of chromosome aberrations, the oncogenic *miR-17-92* polycistronic cluster is the target of the relatively frequent amplification of the 13q31.3 region in MCL.⁴⁷ The genes deregulated by miRs in MCL are involved in pathways relevant for its pathogenesis. Thus, some miRs contribute to the post-transcriptional regulation of *CCND1*,^{9,10} *CDK6* (*miR-29* family), *MAP3K2* (*miR-26a*), or NF-κB pathway (*miR-203* among others).^{68,69} *PTEN* and other survival-related genes may be deregulated by *miR-19a/b*,⁷⁰ and *miR-17-5p* and *miR-20a* are able to repress the *CDKN1A* gene.⁷¹ The relevance of miR deregulation in this tumor has been also highlighted by the prognostic significance of some miRs such as *miR-20b* and *miR-29* family^{68,69} or *miR-17-5p* and *miR-20a* in cooperation with *MYC*.⁴⁷

INDOLENT NON-NODAL MANTLE CELL LYMPHOMAS: AN ALTERNATIVE PATHOGENETIC PATHWAY?

The common understanding of MCL as a very aggressive lymphoma with relative short survival of the patients and frequent requirement of an intensive therapy has led

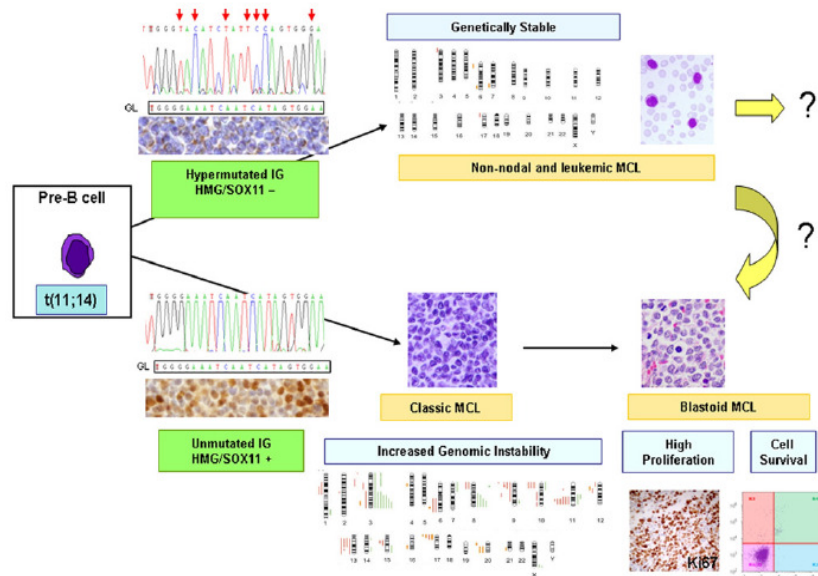


Figure 5. Hypothetic models of molecular pathogenesis in the development of MCL. The t(11;14) translocation activating cyclin D1 expression may be followed by two different pathways. Conventional MCLs have more common unmutated or very low mutated *IGHV* genes and express high levels of *SOX11* and other genes of the high-mobility group (HMG) of transcription factors, accumulate a high number of chromosomal aberrations usually associated with inactivation of genes of the DNA damage repair pathway, deregulation of cell cycle elements, and activation of survival pathways. A small subset of MCLs presenting predominantly with a non-nodal and leukemic disease and a relative indolent clinical course have more frequent hypermutated *IGHV*, low number of chromosomal aberrations, and low or no expression of HMG and *SOX11* among other genes.

investigators to overlook a subset of patients that may follow an indolent clinical course even without chemotherapy for a long period of time. This indolent clinical evolution was recognized initially in patients presenting with splenomegaly and a leukemic non-nodal disease.^{6,72} The relevance of identifying these patients at diagnosis has been highlighted by recent studies showing that some MCL patients may not require immediate treatment and may benefit from a watchful waiting for several months or even years without impairing their outcome.^{73,74} All of these tumors carried the t(11;14) translocation and expressed cyclin D1, but the different clinical presentation and indolent behavior raised the question whether they were real MCLs or whether they could correspond to other subtypes of splenic or leukemic lymphomas. In a recent study we addressed this question by comparing the gene expression profile of a subset of indolent leukemic MCLs that did not require chemotherapy for more than 2 years with that of a group of conventional MCLs and other leukemic lymphoid neoplasias including CLL, splenic marginal zone lymphoma, hairy cell leukemia, and leukemic follicular lymphoma. Interestingly, the indolent MCLs were molecularly more similar to conventional MCLs than to any other type of lymphoid neoplasia, supporting the idea that they correspond to the same molecular disease.⁷⁵

In spite of the similar global expression signature, these MCLs with a very indolent behavior also had

some clinical, genetic, and molecular differences compared to conventional MCLs. The tumors presented clinically with leukemia and splenomegaly and usually with a non-nodal or minimally nodal disease, confirming that they may correspond to the forms of MCL previously recognized as splenic or non-nodal.^{6,72} These indolent MCLs also had a striking simple karyotype with virtually no genetic alterations in addition to the t(11;14), a higher number of somatic mutations in the *IGHV*, and less alterations in oncogenic loci frequently altered in conventional MCL.⁷⁵ They also had very low or virtual lack of expression of a signature of genes that were highly expressed in the conventional tumors. Interestingly, one of the genes of the signature was *SOX11* and other genes of the high mobility group (HMG) of transcription factors that interact with chromatin and are relevant in cancer.⁷⁶ An expanded study of *SOX11* protein expression in an independent large series of MCL confirmed that its negativity was associated with a predominant non-nodal disease and a significant better outcome than *SOX11*-positive MCL.⁷⁵

These findings suggest that indolent MCL with a predominant non-nodal and leukemic disease, frequently associated with splenomegaly, may correspond to a different molecular subtype of MCL (Figure 5). The natural history and biology of this subtype of MCL need to be more thoroughly investigated. Some patients with a non-nodal and leukemic presentation may progress to

an aggressive behavior after several years of a stable disease. On the other hand, some patients with SOX11 negative MCL may present with pleomorphic morphology at diagnosis and a very aggressive behavior.²⁶ Although these patients may represent the transformed and advanced phase of the SOX11-negative MCL, more studies are needed to better understand these tumors and the potential interest in the management of the patients.

Acknowledgments

The authors thank Dr Sílvia Beà and Dr Kostas Stamatopoulos for their helpful comments on the manuscript. They also thank Dr Andreas Rosenwald, Dr German Ott, the European Mantle Cell Lymphoma Consortium, and the Mantle Cell Lymphoma Consortium from the Lymphoma Research Foundation for their continuous collaboration in the study of this lymphoma.

REFERENCES

- Jares P, Colomer D, Campo E. Genetic and molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: perspectives for new targeted therapeutics. *Nat Rev Cancer*. 2007;7:750–62.
- Jares P, Campo E. Advances in the understanding of mantle cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2008;142:149–65.
- Welzel N, Le T, Marculescu R, et al. Templated nucleotide addition and immunoglobulin JH-gene utilization in t(11;14) junctions: implications for the mechanism of translocation and the origin of mantle cell lymphoma. *Cancer Res*. 2001;61:1629–36.
- Kienle D, Krober A, Katzenberger T, et al. VH mutation status and VDJ rearrangement structure in mantle cell lymphoma: correlation with genomic aberrations, clinical characteristics, and outcome. *Blood*. 2003;102:3003–09.
- Hadzidimitriou A, Agathagelidis A, Murray F, et al. Sequence-based evidence for antigen selection in mantle cell lymphoma: remarkable immunoglobulin gene repertoire biases, stereotyped antigen-binding sites and recurrent hypermutations in certain subsets. 51st American Society of Hematology Annual Meeting, New Orleans, LA. December 5–8, 2009.
- Orchard J, Garand R, Davis Z, et al. A subset of t(11;14) lymphoma with mantle cell features displays mutated IgVH genes and includes patients with good prognosis, nonnodal disease. *Blood*. 2003;101:4975–81.
- Camacho FI, Algara P, Rodriguez A, et al. Molecular heterogeneity in MCL defined by the use of specific VH genes and the frequency of somatic mutations. *Blood*. 2003;101:4042–6.
- Kolar GR, Mehta D, Pelayo R, Capra JD. A novel human B cell subpopulation representing the initial germinal center population to express AID. *Blood*. 2007;109:2545–52.
- Chen RW, Bemis LT, Amato CM, et al. Truncation in CCND1 mRNA alters miR-16-1 regulation in mantle cell lymphoma. *Blood*. 2008;112:822–9.
- Jiang Q, Feng MG, Mo YY. Systematic validation of predicted microRNAs for cyclin D1. *BMC Cancer*. 2009;9:194.
- Wiestner A, Tehrani M, Chiorazzi M, et al. Point mutations and genomic deletions in CCND1 create stable truncated cyclin D1 mRNAs that are associated with increased proliferation rate and shorter survival. *Blood*. 2007;109:4599–606.
- Sander B, Flygare J, Porwit-MacDonald A, et al. Mantle cell lymphomas with low levels of cyclin D1 long mRNA transcripts are highly proliferative and can be discriminated by elevated cyclin A2 and cyclin B1. *Int J Cancer*. 2005;117:418–30.
- Rosenwald A, Wright G, Wiestner A, et al. The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma. *Cancer Cell*. 2003;3:185–97.
- Betticher DC, Thatcher N, Altermatt HJ, Hoban P, Ryder WD, Heighway J. Alternate splicing produces a novel cyclin D1 transcript. *Oncogene*. 1995;11:1005–11.
- Marzec M, Kasprzycka M, Lai R, et al. Mantle cell lymphoma cells express predominantly cyclin D1a isoform and are highly sensitive to selective inhibition of CDK4 kinase activity. *Blood*. 2006;108:1744–50.
- Klier M, Anastasov N, Hermann A, et al. Specific lentiviral shRNA-mediated knockdown of cyclin D1 in mantle cell lymphoma has minimal effects on cell survival and reveals a regulatory circuit with cyclin D2. *Leukemia*. 2008;22:2097–105.
- Aggarwal P, Vaites LP, Kim JK, et al. Nuclear cyclin D1/CDK4 kinase regulates CUL4 expression and triggers neoplastic growth via activation of the PRMT5 methyltransferase. *Cancer Cell*. 2010;18:329–40.
- Li Z, Jiao X, Wang C, et al. Alternative cyclin D1 splice forms differentially regulated DNA damage response. *Cancer Res*. 2010;70:8802–11.
- Quintanilla-Martinez L, Slotta-Huspenina J, Koch I, et al. Differential diagnosis of cyclin D2+ mantle cell lymphoma based on fluorescence in situ hybridization and quantitative real-time-PCR. *Haematologica*. 2009;94:1595–8.
- Salaverria I, Zettl A, Bea S, et al. Specific secondary genetic alterations in mantle cell lymphoma provide prognostic information independent of the gene expression-based proliferation signature. *J Clin Oncol*. 2007;25:1216–22.
- Gesk S, Klapper W, Martin-Subero JI, et al. A chromosomal translocation in cyclin D1-negative/cyclin D2-positive mantle cell lymphoma fuses the CCND2 gene to the IGK locus. *Blood*. 2006;108:1109–10.
- Wlodarska I, Dierickx D, Vanhentenrijk V, et al. Translocations targeting CCND2, CCND3, and MYCN do occur in t(11;14)-negative mantle cell lymphomas. *Blood*. 2008;111:5683–90.
- Herens C, Lambert F, Quintanilla-Martinez L, Bisig B, Deusings C, de Leval L. Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma with cryptic t(12;14)(p13;q32) and cyclin D2 overexpression. *Blood*. 2008;111:1745–6.
- Mozos A, Royo C, Hartmann E, et al. SOX11 expression is highly specific for mantle cell lymphoma and identifies the cyclin D1-negative subtype. *Haematologica*. 2009;94:1555–62.

25. Ek S, Dictor M, Jerkeman M, Jirstrom K, Borrebaeck CA. Nuclear expression of the non B-cell lineage Sox11 transcription factor identifies mantle cell lymphoma. *Blood*. 2008;111:800-05.
26. Wang X, Asplund AC, Porwit A, et al. The subcellular Sox11 distribution pattern identifies subsets of mantle cell lymphoma: correlation to overall survival. *Br J Haematol*. 2008;143:248-52.
27. Chen YH, Gao J, Fan G, Peterson LC. Nuclear expression of sox11 is highly associated with mantle cell lymphoma but is independent of t(11;14)(q13;q32) in non-mantle cell B-cell neoplasms. *Mod Pathol*. 2010;23:105-12.
28. Lecluse Y, Lebailly P, Roulland S, Gac AC, Nadel B, Gauduchon P. t(11;14)-positive clones can persist over a long period of time in the peripheral blood of healthy individuals. *Leukemia*. 2009;23:1190-3.
29. Christian B, Zhao W, Hamadani M, et al. Mantle cell lymphoma 12 years after allogeneic bone marrow transplantation occurring simultaneously in recipient and donor. *J Clin Oncol*. 2010;28:e629-32.
30. Racke F, Simpson S, Christian B, Blum K, Hasserjian R, Zhao W. Evidence of long latency periods prior to development of mantle cell lymphoma. 52nd ASH Annual Meeting and Exposition. Orlando, FL. December 4-7, 2010.
31. Bea S, Campo E. Secondary genomic alterations in non-Hodgkin's lymphomas: tumor-specific profiles with impact on clinical behavior. *Haematologica*. 2008;93:641-5.
32. Bea S, Ribas M, Hernandez JM, et al. Increased number of chromosomal imbalances and high-level DNA amplifications in mantle cell lymphoma are associated with blastoid variants. *Blood*. 1999;93:4365-74.
33. Rubio-Moscardo F, Climent J, Siebert R, et al. Mantle-cell lymphoma genotypes identified with CGH to BAC microarrays define a leukemic subgroup of disease and predict patient outcome. *Blood*. 2005;105:4445-54.
34. Salaverria I, Espinet B, Carrio A, et al. Multiple recurrent chromosomal breakpoints in mantle cell lymphoma revealed by a combination of molecular cytogenetic techniques. *Genes Chromosomes Cancer*. 2008;47:1086-97.
35. Kohlhammer H, Schwaenen C, Wessendorf S, et al. Genomic DNA-chip hybridization in t(11;14)-positive mantle cell lymphomas shows a high frequency of aberrations and allows a refined characterization of consensus regions. *Blood*. 2004;104:795-801.
36. Nagel I, Szczepanowski M, Martin-Subero JI, et al. Deregulation of the telomerase reverse transcriptase (TERT) gene by chromosomal translocations in B-cell malignancies. *Blood*. 2010;116:1317-20.
37. Schraders M, Pfundt R, Straatman HM, et al. Novel chromosomal imbalances in mantle cell lymphoma detected by genome-wide array-based comparative genomic hybridization. *Blood*. 2005;105:1686-93.
38. Tagawa H, Karnan S, Suzuki R, et al. Genome-wide array-based CGH for mantle cell lymphoma: identification of homozygous deletions of the proapoptotic gene BIM. *Oncogene*. 2005;24:1348-58.
39. Thelander EF, Ichimura K, Collins VP, et al. Detailed assessment of copy number alterations revealing homozygous deletions in 1p and 13q in mantle cell lymphoma. *Leuk Res*. 2006;31:1219-30.
40. Rinaldi A, Kwee I, Taborelli M, et al. Genomic and expression profiling identifies the B-cell associated tyrosine kinase Syk as a possible therapeutic target in mantle cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2006;132:303-16.
41. Vater I, Wagner F, Kreuz M, et al. GeneChip analyses point to novel pathogenetic mechanisms in mantle cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2009;144:317-31.
42. Bea S, Salaverria I, Armengol L, et al. Uniparental disomies, homozygous deletions, amplifications, and target genes in mantle cell lymphoma revealed by integrative high-resolution whole-genome profiling. *Blood*. 2009;113:3059-69.
43. Kawamata N, Ogawa S, Gueller S, et al. Identified hidden genomic changes in mantle cell lymphoma using high-resolution single nucleotide polymorphism genomic array. *Exp Hematol*. 2009;37:937-46.
44. Hartmann EM, Campo E, Wright G, et al. Pathway discovery in mantle cell lymphoma by integrated analysis of high-resolution gene expression and copy number profiling. *Blood*. 2010;116:953-61.
45. Pinyol M, Bea S, Pla L, et al. Inactivation of RB1 in mantle-cell lymphoma detected by nonsense-mediated mRNA decay pathway inhibition and microarray analysis. *Blood*. 2007;109:5422-9.
46. Honma K, Tsuzuki S, Nakagawa M, et al. TNFAIP3/A20 functions as a novel tumor suppressor gene in several subtypes of non-Hodgkin lymphomas. *Blood*. 2009;114:2467-75.
47. Navarro A, Bea S, Fernandez V, et al. MicroRNA expression, chromosomal alterations, and immunoglobulin variable heavy chain hypermutations in mantle cell lymphomas. *Cancer Res*. 2009;69:7071-8.
48. Psyrri A, Papageorgiou S, Liakata E, et al. Phosphatidylinositol 3'-kinase catalytic subunit alpha gene amplification contributes to the pathogenesis of mantle cell lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2009;15:5724-32.
49. Bruce S, Leinonen R, Lindgren CM, et al. Global analysis of uniparental disomy using high density genotyping arrays. *J Med Genet*. 2005;42:847-51.
50. Sharp AJ, Locke DP, McGrath SD, et al. Segmental duplications and copy-number variation in the human genome. *Am J Hum Genet*. 2005;77:78-88.
51. Stankiewicz P, Shaw CJ, Dapper JD, et al. Genome architecture catalyzes nonrecurrent chromosomal rearrangements. *Am J Hum Genet*. 2003;72:1101-16.
52. Kotake Y, Zeng Y, Xiong Y. DDB1-CUL4 and MLL1 mediate oncogene-induced p16INK4a activation. *Cancer Res*. 2009;69:1809-14.
53. Aggarwal P, Lessie MD, Lin DI, et al. Nuclear accumulation of cyclin D1 during S phase inhibits Cul4-dependent Cdt1 proteolysis and triggers p53-dependent DNA rereplication. *Genes Dev*. 2007;21:2908-22.
54. Hernandez L, Bea S, Pinyol M, et al. CDK4 and MDM2 gene alterations mainly occur in highly proliferative and aggressive mantle cell lymphomas with wild-type INK4a/ARF locus. *Cancer Res*. 2005;65:2199-206.
55. Camacho E, Hernandez L, Hernandez S, et al. ATM gene inactivation in mantle cell lymphoma mainly occurs by truncating mutations and missense mutations involving the phosphatidylinositol-3 kinase domain and is associated with increasing numbers of chromosomal imbalances. *Blood*. 2002;99:238-44.

56. Rai R, Dai H, Multani AS, et al. BRIT1 regulates early DNA damage response, chromosomal integrity, and cancer. *Cancer Cell*. 2006;10:145-57.
57. Perez-Galan P, Roue G, Villamor N, Montserrat E, Campo E, Colomer D. The proteasome inhibitor bortezomib induces apoptosis in mantle-cell lymphoma through generation of ROS and Noxa activation independent of p53 status. *Blood*. 2006;107:257-64.
58. Bhat KM, Setaluri V. Microtubule-associated proteins as targets in cancer chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2007;13:2849-54.
59. Neben K, Ott G, Schweizer S, et al. Expression of centrosome-associated gene products is linked to tetraploidization in mantle cell lymphoma. *Int J Cancer*. 2007;120:1669-77.
60. Rizzatti EG, Falcao RP, Panepucci RA, et al. Gene expression profiling of mantle cell lymphoma cells reveals aberrant expression of genes from the PI3K-AKT, WNT and TGFbeta signalling pathways. *Br J Haematol*. 2005;130:516-26.
61. Rudelius M, Pittaluga S, Nishizuka S, et al. Constitutive activation of Akt contributes to the pathogenesis and survival of mantle cell lymphoma. *Blood*. 2006;108:1668-76.
62. Dal CJ, Zancai P, Terrin L, et al. Distinct functional significance of Akt and mTOR constitutive activation in mantle cell lymphoma. *Blood*. 2008;111:5142-51.
63. Peponi E, Drakos E, Reyes G, Leventaki V, Rassidakis GZ, Medeiros LJ. Activation of mammalian target of rapamycin signaling promotes cell cycle progression and protects cells from apoptosis in mantle cell lymphoma. *Am J Pathol*. 2006;169:2171-80.
64. Perez-Galan P, Mora-Jensen H, Weniger MA, et al. Bortezomib resistance in mantle cell lymphoma is associated with plasmacytic differentiation. *Blood*. 2010;117:542-52.
65. Hess J, Herbrecht R, Romaguera J, et al. Phase III study to evaluate temsirolimus compared with investigator's choice therapy for the treatment of relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2009;27:3822-29.
66. Gelebart P, Anand M, Armanious H, et al. Constitutive activation of the Wnt canonical pathway in mantle cell lymphoma. *Blood*. 2008;112:5171-9.
67. Ortega-Paino E, Fransson J, Ek S, Borrebaeck CA. Functionally associated targets in mantle cell lymphoma as defined by DNA microarrays and RNA interference. *Blood*. 2008;111:1617-24.
68. Zhao JJ, Lin J, Lwin T, et al. microRNA expression profile and identification of miR-29 as a prognostic marker and pathogenetic factor by targeting CDK6 in mantle cell lymphoma. *Blood*. 2010;115:2630-9.
69. Di LL, Gomez-Lopez G, Sanchez-Beato M, et al. Mantle cell lymphoma: transcriptional regulation by microRNAs. *Leukemia*. 2010;24:1335-42.
70. Mu P, Han YC, Betel D, et al. Genetic dissection of the miR-17~92 cluster of microRNAs in Myc-induced B-cell lymphomas. *Genes Dev*. 2009;23:2806-11.
71. Cloonan N, Brown MK, Steptoe AL, et al. The miR-17-5p microRNA is a key regulator of the G1/S phase cell cycle transition. *Genome Biol*. 2008;9:R127.1-4.
72. Angelopoulou MK, Siakantaris MP, Vassilakopoulos TP, et al. The splenic form of mantle cell lymphoma. *Eur J Haematol*. 2002;68:12-21.
73. Martin P, Chadburn A, Christos P, et al. Outcome of deferred initial therapy in mantle-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2009;27:1209-13.
74. Eve HE, Furtado MV, Hamon MD, Rule SA. Time to treatment does not influence overall survival in newly diagnosed mantle-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2009;27:e189-90.
75. Fernandez V, Salamero O, Espinet B, et al. Genomic and gene expression profiling defines indolent forms of mantle cell lymphoma. *Cancer Res*. 2010;70:1408-18.
76. Fusco A, Fedele M. Roles of HMGA proteins in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007;7:899-910.

**REVISIÓ 2: Noves perspectives i reptes en la comprensió del limfoma
de cèl·lules del mantell**

Annals of Oncology. Juny del 2011, 22:iv32-iv35

Resum:

El limfoma de cèl·lules del mantell (LCM) és una neoplàsia de cèl·lules B que ha estat molt ben caracteritzada en els darrers anys. El reconeixement de la t(11;14)(q13;32) i la sobreexpressió de ciclina D1 com a marques genètiques i moleculars del tumor, han estat elements claus en el reconeixement de l'ampli espectre de troballes clíniques, patològiques i manifestacions biològiques de la malaltia. L'expressió de ciclina D1 s'utilitza habitualment com un dels elements més importants en el diagnòstic d'aquest limfoma. El terme mantell reflexa la idea de que l'homòleg cel·lular normal és un limfòcit l'estat fisiològic del qual és el microambient de la zona del mantell del fol·licle limfoide secundari. Aquest punt de vista és recolzat per la tendència de les cèl·lules tumorals a créixer i ampliar aquesta àrea, i a expressar el propi fenotip de les cèl·lules del mantell. El LCM és clínicament considerat un dels limfomes més agressius amb una escassa resposta als tractaments actuals, freqüents recaigudes i una supervivència curta. Aquest comportament ha donat lloc a la recomanació de règims terapèutics intensos i a l'exploració de noves estratègies que utilitzen nous fàrmacs dirigits a dianes específiques. Tot i la bona caracterització del LCM, estudis moleculars recents i noves observacions clíniques estan donant lloc a noves perspectives sobre la ontogènia i la patogènesi d'aquest limfoma i es qüestiona alguna de les idees prèvies sobre aquesta neoplàsia. A la següent revisió es consideren els nous conceptes de desenvolupament del LCM que poden tenir un impacte en la comprensió de la seva patogènesi i podrien influir en la pràctica clínica diària.

II. New perspectives and challenges in the understanding of mantle cell lymphoma

A. Navarro & E. Campo

Hematopathology Section, Department of Anatomic Pathology, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Barcelona, Spain

introduction

Mantle cell lymphoma (MCL) is a B-cell neoplasia that has been well characterized in recent years. Recognition of the t(11;14)(q13; q32) and cyclin D1 overexpression as the genetic and molecular hallmarks of the tumor have been key elements in recognizing the broad spectrum of clinical, pathological and biological manifestations of the disease [1]. Cyclin D1 expression is now routinely used as one of the most important elements in the diagnosis of this lymphoma. The term mantle cell lymphoma reflects the idea that the normal cell counterpart of this tumor is a lymphocyte whose physiological microenvironment is the mantle zone of the secondary lymphoid follicle. This view is supported by the tendency of the tumor cells to grow and expand this area and to express a phenotype also found in a subset of mantle cells. MCL is considered clinically one of the most aggressive lymphomas with short responses to current therapies, frequent relapses and a relatively short median survival. This behavior has led to the recommendation of intense therapeutic regimens and exploration of new strategies with more recently developed drugs targeting specific pathogenetic mechanisms. In spite of the good characterization of MCL, recent molecular studies and clinical observations are opening new perspectives on the ontogeny and pathogenesis of this lymphoma that challenge some of our previous ideas about the disease. Here we consider new developing concepts in MCL that may have an impact on our understanding of its pathogenesis and may influence our clinical practice.

MCL does not always carry the t(11;14) translocation and express cyclin D1

The t(11;14)(q13;q32) translocation and upregulation of cyclin D1, which is not expressed in normal B lymphocytes, are considered the primary pathogenetic mechanisms in the development of MCL. Cyclin D1 is a key regulatory element of the cell cycle at the G₁-S phase transition [1]. The relevance of cyclin D1 has been highlighted by the identification of several mechanisms used by the tumor cells to increase further the expression of cyclin D1 beyond the constitutive activation provided by the translocation. The cyclin D1 gene (*CCND1*) is transcribed in two main isoforms of 4.5 and 1.5 kb. Both mRNA transcripts contain the whole coding region of the gene and differ only in the length of their 3' untranslated region (UTR).

Some tumors have secondary chromosomal rearrangement or point mutations in the 3' UTR of the longer isoform that truncate the sequence and generate more stable transcripts by eliminating the destabilizing AUUUA sequences and binding sites for different microRNAs [1-3]. These alterations generate higher expression of cyclin D1 and are associated with more proliferative and aggressive tumors. An additional mechanism targeting cyclin D1 is the amplification of the translocated t(11;14) allele, which results in very high levels of cyclin D1 expression [4].

Given the relevance of the t(11;14) translocation and cyclin D1 deregulation in MCL, it was very puzzling for pathologists to recognize some lymphomas with the morphological and phenotypic features of MCL that were negative for cyclin D1 expression and also lack the t(11;14) translocation. The marked difference in the clinical outcome of patients with true MCL compared with the more indolent behavior of other small B-cell lymphomas mimicking MCL made this differential diagnosis of paramount importance in the management of the patients [5]. For some time, initial difficulties in the immunohistochemical detection of cyclin D1 raised the controversy of whether those cyclin D1-negative tumors resembling MCL were real, were technical artifacts or corresponded in fact to other small B-cell lymphomas not related to this entity. This controversy was over when a gene expression profile study of a number of these putative cyclin D1-negative MCLs showed that they had a global expression signature similar to that of conventional cyclin D1-positive tumors confirming that they corresponded to the same entity [6]. This idea was further supported by the identification of a similar profile of secondary genomic alterations [7].

Intriguingly, the cyclin D1-negative MCLs had high expression of cyclin D2 or D3 suggesting that the upregulation of these G₁ cyclins could take over the oncogenic role of cyclin D1 in these tumors. In fact, some cyclin D1-negative MCLs carry chromosomal translocations, sometimes cryptic, fusing *CCND2* or *CCND3* to *IG* loci, particularly light chain genes. These cases have extremely high levels of expression of these cyclins suggesting that they may be useful in recognizing the tumors. However, the use of cyclin D2 and D3 in routine diagnosis is hampered by the fact that both are also expressed in other B-cell lymphomas. Their mRNA levels in the cyclin D1-negative MCLs with translocations of the genes are

II. New perspectives and challenges

significantly higher than in other tumors but the differences are difficult to discriminate using routine immunohistochemistry [8]. On the other hand, the number of cyclin D1-negative MCLs carrying *CCND2* or *CCND3* translocation is low, raising the question of the potential oncogenic mechanism involved in most MCLs lacking the translocation of all these cyclins [8].

Searching for new genes differentially expressed in MCL, Ek et al. [9] identified SOX11, a neuronal transcription factor of the high mobility group, as a very specific marker of MCL since it was highly expressed in virtually all these tumors whereas it was negative in normal lymphocytes and most other lymphoid neoplasms [9–11]. Interestingly, a study of the initial cyclin D1-negative MCLs identified by gene expression profiling and an additional subset of cases showed that SOX11 was positive in all of them, indicating that it may be an excellent marker by which to recognize these tumors [10]. SOX11 is also expressed in 30%–50% of Burkitt's lymphoma at lower levels and virtually all B- and T-lymphoblastic lymphomas but not in other types of lymphoma [10, 11]. The different morphological and phenotypic features of these tumors compared with MCL should not represent a problem in the use of SOX11 to identify cyclin D1-negative MCLs in clinical practice. The availability of a reliable marker may open the possibility of studying the cyclin D1-negative MCLs and define whether these patients may also benefit from the new therapeutic strategies.

is MCL derived from a naïve B-cell?

The t(11;14)(q13;q32) translocation occurs in the bone marrow in the early B cell at the pre-B stage of differentiation when the cell is initiating *IG* gene rearrangement with the recombination of the V(D)J segments [1]. Although the translocation occurs at a very early stage, the MCL cells are mature B lymphocytes that express genes normally detected in naïve B cells, like IgD and the T-cell-associated CD5 antigen. The phenotype and topographic distribution of these cells are similar to a small subpopulation of naïve B CD5+ cells, producing low-affinity polyreactive antibodies that colonize the normal mantle zone of the lymphoid follicles and tend to recirculate [12]. These observations and the predominance of unmutated *IG* genes observed in most MCL lead to the common understanding that the normal counterpart of this tumor is a mature naïve B-cell.

Several studies have shown that 15%–40% of MCLs carry *IGHV* somatic hypermutations and have a strong bias in the *IGHV* gene repertoire with *IGHV3-21*, *IGHV4-34*, *IGHV1-8* and *IGHV3-23* used by 46% of the cases [13]. The mutational load and the associated light chain gene also differ between the *IGHV* families. Thus *IGHV3-21*, in contrast to *IGHV3-23* and *IGHV4-59*, is almost exclusively found in germline configuration and is commonly paired with the light chain *IgL3-19*. The fact that the mutation frequency is not random and is related to the utilization of specific *IGHV* genes suggests that at least a subgroup of MCL is not derived from naïve B cells but from cells expanding under the stimulation of certain antigens. This idea is further supported by the recognition of a bias association of certain *IGHV*, *IGHD* and *IGHJ* genes with restricted VH CDR3 motifs in 10% of tumors. This scenario is similar to the stereotyped *IG* rearrangements observed in chronic lymphocytic leukemia (CLL) [14]. However, the family

usage and clusters of the rearranged *IG* genes are different in the two diseases suggesting that the potential mechanisms involved in the clonal selection may be different. On the other hand, in contrast to CLL, there is no clear evidence of a relationship with *IGHV* mutational status using a 2% cut-off [15]. All this information suggests that most MCLs may derive from antigen-experienced cells. However, the different levels of somatic mutations in the *IGHV* genes observed in MCL may indicate that different subpopulations of B cells could be considered normal counterparts of the tumor. Thus, the fact that ~15% of the tumors have a large number of somatic mutations would suggest that these tumors originate in cells that have had strong experience through the germinal center. Conversely ~30%–50% of the cases have total homology with the germline sequence of the *IGHV* genes and these cases may derive from cells without any exposure to the mutational machinery. Finally, a number of cases have a low number of somatic mutations. These cases may be related to marginal zone or early germinal center cells similar to the cells described by Kolar et al. [16] that express IgD⁺CD38⁻CD23⁻CD71⁺ cells, have few somatic *IGHV* hypermutations and express AID.

indolent MCLs: do they exist?

Most patients with MCL present with generalized lymphadenopathy and disseminated disease and follow an aggressive clinical evolution. Some observations indicate, however, that some patients may have a disease with a more indolent clinical course. The recognition of these patients is important because they may benefit from more conservative management for some time without apparently harming their global outcome [17].

Studies of prognostic factors in MCL have indicated that tumors with very low proliferation fraction, limited stage or a mantle zone pattern may have a significantly better prognosis with longer survival than the global series of patients [1, 5]. In addition to these parameters, clinical observations recognized a subgroup of patients with MCL of indolent behavior that presented with non-nodal disease, splenomegaly and a leukemic phase [15, 18]. The clinical similarities between this subset of MCL and splenic marginal zone lymphomas raised some questions about the identity of these categories. In a recent study we addressed this question by comparing the gene expression profile of a group of indolent leukemic MCLs that did not require chemotherapy for >2 years with a group of conventional MCLs and other leukemic lymphoid neoplasias including CLL, splenic marginal zone lymphoma, hairy cell leukemia and leukemic follicular lymphoma. Interestingly, the indolent MCLs were molecularly more similar to conventional MCL than to any other type of lymphoid neoplasia supporting the idea that they correspond to the same molecular disease [19]. However, they also had differential expression of a small signature of genes that included among others the lack or low levels of SOX11. Other biological differences were the predominance of highly mutated *IGHV* and very simple karyotypes in the indolent tumors [19]. These findings suggest that MCL with a predominant non-nodal and leukemic disease, frequently associated with splenomegaly and an indolent

II. New perspectives and challenges

Annals of Oncology

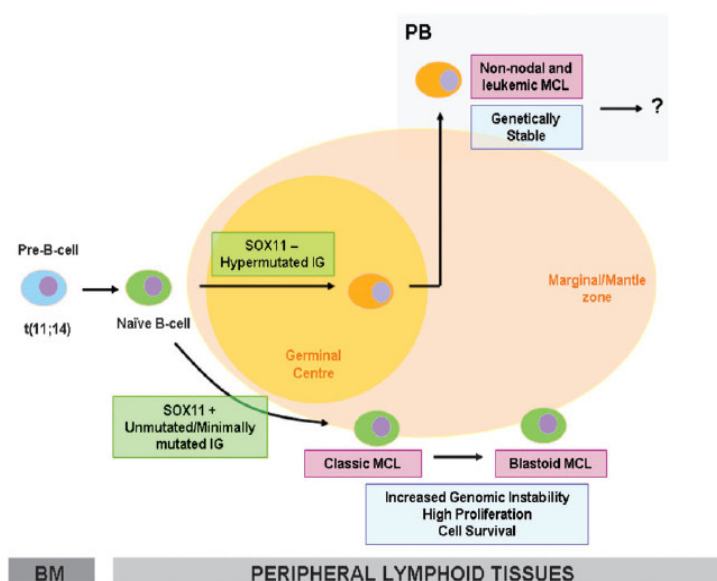


Figure 1. Hypothetical models of two different molecular subtypes of MCL. The naïve B-cell carrying the t(11;14) may evolve into a classic MCL in the mantle or marginal zone with no or limited somatic mutations. These tumors express SOX11 and are genetically unstable. Alternatively, some cells with the t(11;14) translocation may enter the germinal center and undergo somatic hypermutation. These cells are genetically stable and do not express SOX11.

clinical course may correspond to a different molecular subtype of MCL (Figure 1).

The possibility of demonstrating SOX11 by immunohistochemistry in routinely processed biopsies suggests that this detection may assist in recognizing these patients at diagnosis. However, one major limitation is that most patients with an indolent clinical course usually present with a non-nodal and leukemic disease and therefore with limited tissue availability to perform the studies. On the other hand, a recent immunohistochemical study showed that SOX11-negative MCLs had a worse prognosis than SOX11-positive tumors [20]. One possible explanation for this apparent discordance is that the SOX11-negative cases observed in the later study could correspond to a progressed or transformed stage with generalized lymphadenopathy of SOX11-negative tumors. Although this idea needs to be confirmed by further studies it would suggest that SOX11-negative MCLs may have an indolent phase and eventually some of the tumors could progress with a generalized lymphadenopathy and aggressive behavior.

funding

This work was supported (in part) by the Spanish Ministry of Science and Innovation (SAF 2008-03630 and BES-2007-16330) and the European Regional Development Fund (ERDF). (R06/0020/0039) from Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII).

references

- Jares P, Colomer D, Campo E. Genetic and molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: perspectives for new targeted therapeutics. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 750–762.

- Westner A, Tehrani M, Chiorazzi M et al. Point mutations and genomic deletions in CCND1 create stable truncated cyclin D1 mRNAs that are associated with increased proliferation rate and shorter survival. *Blood* 2007; 109: 4599–4606.
- Jiang Q, Feng MG, Mo YY. Systematic validation of predicted microRNAs for cyclin D1. *BMC Cancer* 2009; 9: 194.
- Bea S, Salaverria I, Armengol L et al. Uniparental disomies, homozygous deletions, amplifications, and target genes in mantle cell lymphoma revealed by integrative high-resolution whole-genome profiling. *Blood* 2009; 113: 3059–3069.
- Tiemann M, Schrader C, Klapper W et al. Histopathology, cell proliferation indices and clinical outcome in 304 patients with mantle cell lymphoma (MCL): a clinicopathological study from the European MCL Network. *Br J Haematol* 2005; 131: 29–38.
- Fu K, Weisenburger DD, Greiner TC et al. Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study based on gene expression profiling. *Blood* 2005; 106: 4315–4321.
- Salaverria I, Zettl A, Bea S et al. Specific secondary genetic alterations in mantle cell lymphoma provide prognostic information independent of the gene expression-based proliferation signature. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1216–1222.
- Quintanilla-Martinez L, Slotta-Huspenina J, Koch I et al. Differential diagnosis of cyclin D2+ mantle cell lymphoma based on fluorescence in situ hybridization and quantitative real-time-PCR. *Haematologica* 2009; 94: 1595–1598.
- Ek S, Dictor M, Jerkeman M et al. Nuclear expression of the non-B-cell lineage Sox11 transcription factor identifies mantle cell lymphoma. *Blood* 2008; 111: 800–805.
- Mozos A, Royo C, Hartmann E et al. SOX11 expression is highly specific for mantle cell lymphoma and identifies the cyclin D1-negative subtype. *Haematologica* 2009; 94: 1555–1562.
- Dictor M, Ek S, Sundberg M et al. Strong lymphoid nuclear expression of SOX11 transcription factor defines lymphoblastic neoplasms, mantle cell lymphoma and Burkitt's lymphoma. *Haematologica* 2009; 94: 1563–1568.
- Dono M, Cerruti G, Zupo S. The CD5+ B-cell. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 2105–2111.
- Hadzidimitriou A, Agathagelidis A, Murray F et al. Sequence-based evidence for antigen selection in mantle cell lymphoma: remarkable immunoglobulin gene repertoire biases, stereotyped antigen-binding sites and recurrent hypermutations in certain subsets. 2009 ASH Annual Meeting Abstracts. *Blood* 2009; 114 (22): Abstract 1933.

II. New perspectives and challenges

14. Murray F, Darzentas N, Hadzidimitriou A et al. Stereotyped patterns of somatic hypermutation in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia: implications for the role of antigen selection in leukemogenesis. *Blood* 2008; 111: 1524–1533.
15. Orchard J, Garand R, Davis Z et al. A subset of t(11; 14) lymphoma with mantle cell features displays mutated IgVH genes and includes patients with good prognosis, nonnodal disease. *Blood* 2003; 101: 4975–4981.
16. Kolar GR, Mehta D, Pelayo R et al. A novel human B cell subpopulation representing the initial germinal center population to express AID. *Blood* 2007; 109: 2545–2552.
17. Martin P, Chadburn A, Christos P et al. Outcome of deferred initial therapy in mantle-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2009; 27: 1209–1213.
18. Angelopoulou MK, Siakantariz MP, Vassilakopoulos TP et al. The splenic form of mantle cell lymphoma. *Eur J Haematol* 2002; 68: 12–21.
19. Fernandez V, Salameo O, Espinet B et al. Genomic and gene expression profiling defines indolent forms of mantle cell lymphoma. *Cancer Res* 2010; 70: 1408–1418.
20. Wang X, Asplund AC, Porwit A et al. The subcellular Sox11 distribution pattern identifies subsets of mantle cell lymphoma: correlation to overall survival. *Br J Haematol* 2008; 143: 248–252.

“Solamente porque
me equivoco
invento
el laberinto
la busca
la cosa
la causa de
la búsqueda.”

Orides Fontela

5. DISCUSSIÓ

Els treballs generats en aquesta tesi han permès aprofundir en el coneixement del LCM en termes biològics, moleculars i patogènics.

La idea general de que el LCM és invariablement un limfoma agressiu que requereix de tractament intensiu i immediat està sent reconsiderada, degut, en part, al reconeixement de diferents subgrups de pacients que no requereixen tractament durant llargs períodes (Espinete et al., 2005; Eve et al., 2009; Fernandez et al., 2010; Furtado & Rule, 2011; Kimura et al., 2011; Martin et al., 2009; Martin & Leonard, 2011; Nodit et al., 2003; Ondrejka et al., 2011; Orchard et al., 2003) i degut a que el retard en l'aplicació del tractament no sembla posar en perill la supervivència global dels mateixos (Eve et al., 2009; Fernandez et al., 2010; Martin et al., 2009). Aquesta situació representa un nou repte, donat que alguns estudis recents han demostrat que el tractament intensiu, que inclou altes dosis de quimioteràpia i, en alguns protocols, el transplantament de cèl·lules mare hematopoètiques, pot millorar la supervivència dels pacients amb LCM (Dreyling et al., 2005; Geisler et al., 2008; Harel et al., 2011; Romaguera et al., 2010). Amb aquestes observacions, és de vital importància desenvolupar criteris clínics i biològics que permetin ajudar en la selecció d'una estratègia òptima i individual de gestió i tractament de cada pacient.

En un estudi recent del nostre grup es va comparar un subgrup de pacients diagnosticats de LCM amb comportament clínic molt indolent i que no van rebre quimioteràpia durant més de 2 anys des del diagnòstic, amb un altre subgrup de pacients que requeria de tractament en el moment del diagnòstic (Fernandez et al., 2010). Els LCM indolents presentaven unes característiques clíniques i biològiques que diferien de les dels LCM convencionals, suggerint que un subconjunt dels casos podria correspondre a un subtipus biològic particular de la malaltia. No obstant, l'estudi presentava limitacions; un nombre relativament baix de pacients i el seu alt grau de selecció, basat en el que podria considerar-se *end of the spectrum*, en termes de comportament clínic. És a dir, davant l'ampli espectre de comportament clínic observat en pacients de LCM a la vida real, els pacients seleccionats per l'estudi es situaven als extrems, essent un dels grups molt indolent i l'altre molt agressiu, mentre que hi havia pocs casos en les situacions clíniques intermèdies. En aquest estudi, tant els LCM indolents com els convencionals, compartien un perfil d'expressió gènica diferent d'altres síndromes limfoproliferatives de cèl·lula B, indicant que molecularment pertanyien a la mateixa entitat. No obstant

també presentaven diferències en l'expressió d'una petita signatura formada per 13 gens altament expressats en LCM convencionals però negativa o molt baixa en tumors amb comportament indolent, així com diferències en altres característiques clínicomoleculares, incloent mutacions en els gens IGHV ($\leq 95\%$ d'identitat) i poca complexitat genòmica en els casos clínicament indolents.

La presència dels dos subgrups de LCM, es veu corroborada pel primer article presentat en aquesta tesi amb l'anàlisi immunogenètic del BcR, donat que l'estat mutacional de les IG també discrimina entre dos subgrups diferents de pacients. La rellevància clínica de l'estat mutacional de les IG ha estat controvertida en LCM. La majoria d'estudis previs han utilitzat un 98% com a llindar d'identitat per discriminar dos grups de pacients, però l'aplicació d'aquest *cut-off* del 2% podria suposar una problemàtica. Aquest punt de tall s'ha utilitzat àmpliament per al pronòstic de la LLC però podria no ser el més adequat fora d'aquest context, donat que podria emascarar l'heterogeneïtat biològica (i inclús clínica) de la neoplàsia, com suggereix un estudi recent on s'observa que els subgrups de pacients de LCM amb diferent càrrega mutacional presenten marcades diferències immunogèniques, inclús quan es comparen casos amb un nombre de mutacions limitades (identitat amb la línia germinal pròxima al 98%) amb casos sense mutacions (100% d'identitat) (Hadzidimitriou et al., 2011).

En la nostra sèrie el millor llindar per discriminar ambdós subgrups correspon al 97% d'identitat. En l'estudi anterior ja havíem demostrat la correlació amb bon pronòstic en casos altament mutats utilitzant el *cut-off* de $<95\%$ d'identitat (Fernandez et al., 2010). En l'actual treball estratifiquem els pacients en 4 estats mutacionals (enlloc de dos) i confirmem un biaix en la distribució dels gens IGHV, IGHD i IGHJ, suggerint un procés de selecció antigènica com a responsable de l'expansió clonal en certs subgrups de LCM. Les principals diferències clíniques i biològiques entre pacients amb elevada o baixa càrrega mutacional en els gens de les IG corresponen a: el repertori de gens IGHV utilitzat, l'expressió del marcador de membrana CD5 i SOX11, la complexitat genòmica, el perfil d'expressió d'alguns gens, la distribució dels casos en funció del sexe i la presentació ganglionar. Hem observat que IGHV1-8, IGHV4-34, IGHV3-21 i IGHV5-51 s'usen principalment en casos poc mutats, mentre que IGHV3-23 i, preferencialment, IGHV4-59 estan presents en casos amb elevada càrrega mutacional. Pel que fa a altres característiques diferencials, CD5 es detecta en la gran majoria de

LCM convencionals, però curiosament la meitat dels casos altament mutats presenta negativitat per aquest marcador. La poca complexitat genòmica dels casos amb IG mutades concorda amb l'absència o el baix nombre d'alteracions en el gen *ATM* (Camacho et al., 2002; Salaverria et al., 2008). Altres diferències clíniques a destacar són que el 40% dels casos amb IG mutades són dones respecte al 20% en els LCM amb IG no mutades, i que el 82% dels casos sense mutacions en els gens de les IG presenta limfadenopaties (respecte el 37%). Cal destacar que la nostra sèrie estava enriquida amb casos leucèmics degut a les especialitats dels nostres centres i institucions col·laboradores, la majoria, laboratoris de referència d'hematologia amb predomini de pacients leucemitzats.

Aquests dos subgrups definits segons l'estat mutacional de les IG també presenten diferències en el pronòstic, el curs clínic de la malaltia i la supervivència global. Els pacients amb elevada càrrega mutacional (utilitzant un llindar del 97%) presenten millor pronòstic i una supervivència més llarga (supervivència global als 5 anys: 59% per casos mutats vs. 40% per no mutats). De manera anàloga a altres publicacions, els LCM que utilitzen IGHV3-21 tenen tendència a presentar un millor pronòstic (Thelander & Rosenquist, 2008), independentment de l'estat mutacional, contràriament al que passa amb el reordenaments de IGHV3-23, tot i que les diferències no són estadísticament significatives.

Els nostres resultats confirmen i amplien significativament les observacions anteriors que afirmen que el repertori d'IG està esbiaixat, més de la meitat dels casos queden repartits en només 5 reordenaments, indicant la presència d'una pressió selectiva en el modelatge del BcR. Per extensió, aquestes troballes també impliquen que un conjunt limitat d'antígens i/o superantígens pugui estar específicament involucrat en el desenvolupament del LCM. S'han publicat evidències addicionals a favor d'aquesta idea, donades per a la comparació del repertori de gens de les IG de LCM amb el de cèl·lules B normals (Wu et al., 2010), incloent cèl·lules B *naïve* i cèl·lules B d'altres neoplàsies com la LLC (Agathangelidis et al., 2011) o el LZME (Bikos et al., 2012). Aquest darrer estudi va revelar perfils molt diferents, específicament amb l'ús de IGHV3-21 i IGHV1-8, indicant que el desenvolupament de limfomes podria donar-se a través de la selecció d'estímuls antigènics diferents.

De manera similar al descrit en LLC, un petit percentatge dels BcR del LCM podrien estar estereotipats, és a dir, els casos es poden assignar en clústers definits per l'ús d'una família IGHV idèntica i restriccions en els motius del VH CDR3. Gràcies a eines bioinformàtiques s'ha documentat per primera vegada que aproximadament un 10% dels casos de LCM compleixen aquestes característiques i formen part d'un estereotip (Hadzidimitriou et al., 2011). L'existència de la similitud entre el BcR de casos no relacionats i distants geogràficament juga a favor de les observacions descrites en aquesta tesi. A més, la construcció d'aquests patrons compartits en funció del VH CDR3 podria ser la base de reactivitat per a un antígen comú i potser l'explicació al comportament biològic dels clons malignes. Les comparacions d'aquests motius entre neoplàsies demostren que existeix especificitat per a cada malaltia, de manera que els BcR de LCM difereixen notablement dels de la LLC, inclús per casos amb un mateix reordenament. Possiblement això podria indicar que els antígens als quals responen podrien ser diferents i, en conseqüència, estarien sotmesos a diferents mecanismes de limfomagènesi.

La comparació dels perfils d'expressió entre LCM indolents i LCM convencionals del primer estudi publicat (Fernandez et al., 2010), estava realitzada en mostres *end of the spectrum*, separades en funció del seu comportament indolent i la necessitat de tractament. Ampliant-ne el número de mostres i fent la comparació dels perfils d'expressió en funció de l'estat mutacional de les IG (mutat vs. no mutat) independentment de la necessitat de tractament o de la supervivència, es van observar més gens diferencialment expressats en ambdós sentits (395 gens altament expressats en casos no mutats i 123 en LCM mutats). Mitjançant anàlisis d'enriquiment funcional es va observar que aquests 518 gens diferencialment expressats pertanyien a vies relacionades amb diferents processos biològics i cèl·lula d'origen. Els LCM amb IG mutades sobreexpressaven gens implicats amb els processos de traducció, biogènesis del ribosoma i regulació de l'activació de cèl·lules B. Mentre que els casos de LCM no mutats estaven enriquits amb gens relacionats amb la regulació de la transcripció, l'apoptosi, la mort cel·lular i la resposta a estímuls extracel·lulars. Cal destacar que ambdós subgrups no presentaven diferències a nivell de la signatura de proliferació (Rosenwald et al., 2003), com s'ha publicat en alguns estudis, això podria ser degut al fet que aquesta signatura està descrita en biòpsies de LCM i no en mostres de sang perifèrica com les que s'utilitzen en aquesta tesi. El model de predicció de

supervivència (Blenk et al., 2008) no mostrava una clara significació, però sí una determinada tendència dels casos LCM amb IG mutades a presentar un índex menor (relacionat amb millor pronòstic).

Com hem esmentat anteriorment i de manera interessant, els anàlisis dels nous arrays d'expressió van mostrar implicació de processos d'activació, desenvolupament i maduració de cèl·lula B i T, que podrien indicar que les cèl·lules implicades en ambdós subgrups tumorals es podrien trobar en diferent estadi de desenvolupament cel·lular. Encara que la translocació oncogènica s'adquireix en una cèl·lula B immadura, el tumor està format per limfòcits B madurs que tendeixen a créixer a la zona del mantell dels fol·licles i que presenten un fenotip similar a les cèl·lules B normals presents en aquesta localització. L'expressió d'IgD i de CD5, així com el predomini de gens de les IG no mutats observats en estudis inicials, suggereix que la cèl·lula homòloga normal d'aquest tumor podria correspondre a una cèl·lula B *naïve*, però el biaix en el reordenament (Kienle et al., 2003) i la presència de mutacions somàtiques en les IG en un percentatge més elevat del previst, suggereix que almenys un subgrup de casos amb LCM provenen de l'expansió clonal de cèl·lules B que han tingut contacte antigènic (Figura 23).

Donat que el nombre de mutacions en gens IGHV en la majoria dels LCM és baix (només el 14% dels tumors té més del 3% de mutacions somàtiques) s'ha suggerit que la cèl·lula d'origen de la majoria dels casos no està sota una gran influència de la maquinària d'hipermutació somàtica present en el CG (Hadzidimitriou et al., 2011). Cal destacar que Kolar *i col.* (Kolar et al., 2007), han identificat una cèl·lula B madura anomenada *pro-germinal center cell* considerada com un pas intermedi entre la cèl·lula *naïve* i la cèl·lula del centre germinal, que es caracteritza per l'expressió de IgD+CD38-CD23-CD71+ i de citidina deaminasa (AID), així com per tenir poques mutacions en els gens de les IG. Aquestes cèl·lules podrien ser considerades com l'homòleg normal d'alguns casos de LCM. Per altra banda, el 14% dels casos presenta un elevat percentatge de mutacions en les IG (<97% d'identitat) i podria derivar de cèl·lules amb experiència de CG.

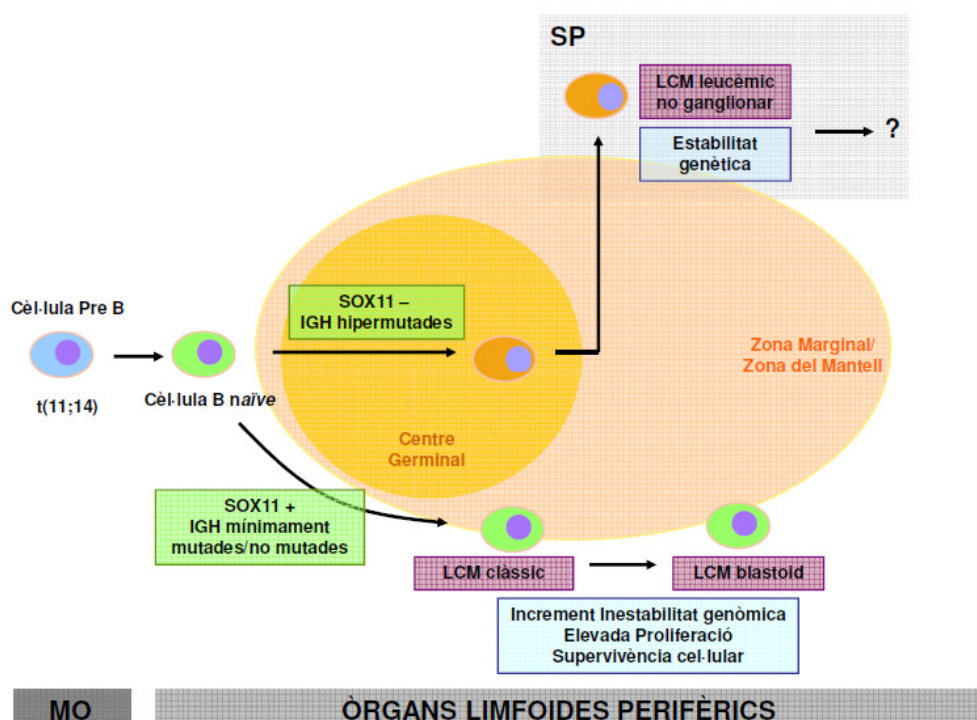


Figura 23. Model hipotètic dels dos subtipus moleculars de LCM. La cèl·lula B *naïve* portadora de la translocació t(11;14) pot evolucionar a cap un LCM convencional a la zona marginal o a la zona del mantell amb un número limitat o sense mutacions somàtiques en els gens IGHV. Aquests tumors expressen SOX11 i són genèticament inestables. Alternativament, algunes d'aquestes cèl·lules amb la translocació poden entrar al CG i sotmetre's al procés de SHM. Aquestes cèl·lules són genèticament estables i no expressen SOX11, tot i que alguns casos després d'uns anys de comportament indolent poden tornar-se clínicament agressius. (Abreviatures: MO; moll de l'os, SP; sang perifèrica)

Per poder incidir en la ontogènia i la cèl·lula d'origen del LCM, en el nostre estudi vam realitzar un anàlisi d'enriquiment de vies interrogant quatre signatures corresponents a diferents estadis maduratius de la diferenciació de cèl·lules B (cèl·lula B *naïve*, cèl·lules del CG, cèl·lules B memòria i cèl·lules plasmàtiques) en els diferents subgrups de pacients. Els resultats obtinguts demostren que els LCM amb IG mutades i no mutades podrien derivar d'una cèl·lula limfoide diferent, donat que els LCM amb IG mutades presenten una sobreexpressió de la signatura de cèl·lula B memòria, mentre que els LCM amb IG no mutades estan enriquits en la signatura de cèl·lules *naïve*, corroborant, així, les observacions esmentades en paràgrafs anteriors.

En els primers anàlisis (Fernandez et al., 2010) de comparació dels perfils d'expressió de mostres de sang perifèrica de LCM indolents i LCM convencionals, es va detectar l'expressió diferencial de 13 gens, entre els quals s'inclouïa *SOX11*, *HDGFRP3* i *DBN1*. En un dels treballs presentats en aquesta tesi es va dissenyar un senzill assaig de qPCR, que incloïa aquests 3 gens, que clarament distingeixen entre LCM indolents i convencionals i els nivells d'expressió dels quals presentaven una bona correlació entre l'array i la qPCR, per tal de desenvolupar una eina assequible que permetés diferenciar fàcilment ambdós subgrups de pacients. Degut a que la forma indolent de LCM es presenta amb freqüència de manera leucèmica sense afectació a ganglis limfàtics, vam aplicar aquest assaig a una sèrie independent de 68 mostres de sang perifèrica, amb almenys un 30% de cèl·lules tumorals. La combinació de l'expressió d'aquests 3 gens segrega les mostres en dos subgrups de LCM amb elevada o baixa expressió d'aquesta signatura simplificada.

Igual com passa amb les immunoglobulines, l'estratificació dels pacients segons l'expressió de *SOX11*, un dels tres gens seleccionats de la signatura i marcador relativament fiable del LCM (Dictor et al., 2009; Ek et al., 2008; Mozos et al., 2009), també està relacionat amb el pronòstic; l'expressió negativa s'associa amb una millor supervivència, ja observat en altres estudis independents (Fernandez et al., 2010; Ondrejka et al., 2011), tot i que curiosament, s'ha descrit el contrari en dos sèries de pacients que presentaven afectació ganglionar (Wang et al., 2008b; Nygren et al., 2012). En el nostre estudi, la combinació dels 3 gens de la signatura *SOX11*, *HDGFRP3* i *DBN1* permetia una millor predicció de la supervivència global comparant amb qualsevol dels gens de manera individual. En aquest estudi les mostres leucemitzades, amb baixa expressió de la signatura, presentaven mutacions en els gens de les IG, no presentaven limfadenopaties i tenien poques alteracions genètiques. Tot i el bon pronòstic que presentaven aquests casos, alguns d'ells morien ràpidament després del diagnòstic o progressaven clínicament. De manera interessant, la detecció de la deleció de 17p tenia un impacte advers sobre el pronòstic d'aquests pacients suggerint que, de manera similar als LCM convencionals i altres neoplàsies limfoides, l'adquisició d'alteracions en 17p o mutacions en el gen *TP53* podria ser un mecanisme de progressió tumoral i alterar el pronòstic dels pacients (Bea et al., 1999; Greiner et al., 1996; Halldorsdottir et al., 2011a). Aquesta troballa suggereix l'avaluació de les

alteracions en aquest loci de manera rutinària, donat que podria ser important per refinar el pronòstic dels pacients.

Tot i que les evidències semblen clares, alguns autors posen en dubte el paper pronòstic de *SOX11* en el LCM. Recentment i contràriament al que es defensa en aquesta tesi, Nygren L *et al.* (Nygren et al., 2012) en un estudi de 186 LCM demostra que els casos *SOX11* negatius presenten limfocitosi amb més freqüència, tenen LDH elevada i requereixen tractament en el moment del diagnòstic. A més, es conclou que aquest factor de transcripció no es pot utilitzar per predir un curs clínic indolent de la malaltia (Nygren et al., 2012). Una possible explicació a aquesta discordança podia ser que els casos *SOX11* negatius dels quals disposen són mostres de teixit i es podrien trobar en una fase progressada i simptomàtica de la malaltia, en la qual aquesta podria haver adquirit mutacions oncogèniques (a *TP53*, per exemple) i un comportament agressiu. Essent així, se'ls hauria passat per alt una possible primera fase leucèmica i indolent d'aquests pacients. En aquest estudi, 9/13 (69%) del casos *SOX11* negatius estudiats presenten tinció per IHQ de p53, suggerint la presència de mutacions el gen *TP53* i coincidint, per tant, amb casos *SOX11* negatius amb deleció de 17p i mutació de *TP53* que presenten un comportament clínic agressiu.

El perfil genòmic de mostres de LCM amb elevada i baixa expressió de la signatura van ser analitzades mitjançant la tècnica d'SNP-arrays. Ambdós grups tenien un perfil d'alteracions cromosòmiques característic de LCM, però els tumors amb elevada signatura presentaven significativament més guanys a 3q i pèrdues a 9p i 11q ($P=0.016$, 0.0017 i 0.029 respectivament). En termes generals, els casos que formen aquest grup també presentaven més freqüentment complexitat genòmica (≥ 5 alteracions per cas) respecte els tumors amb baixa expressió (80% vs 35% respectivament, $P=0.001$). De manera interessant 6 dels casos amb baixa expressió de la signatura presentaven genomes complexos, amb pèrdues a 17p, i a 5 d'aquests se'ls va detectar mutació del gen *TP53*. Mutacions en aquest gen també van ser detectades en 6 dels 10 LCM amb elevada expressió de la signatura que també presentaven alteracions a 17p.

De manera similar al que hem descrit anteriorment per *SOX11* i l'estat mutacional de les IG, l'anàlisi del perfil d'expressió de 86 miRs seleccionats de LCM leucèmics i ganglionars, també va demostrar la presència de dos subgrups de tumors amb marcades

diferències biològiques, com les descrites anteriorment: l'estat mutacional de les IG, la signatura de proliferació i el nombre d'alteracions cromosòmiques, així com diferències en el perfil d'expressió amb els controls utilitzats (cèl·lules purificades CD5+ i CD5-). El miR-181a, associat a un comportament agressiu a la LLC i a la progressió tumoral del mieloma múltiple (Calin et al., 2005; Chang et al., 2008; Pichiorri et al., 2008), és el miR més diferencialment expressat entre ambdós clústers de mostres. Mentre que els miR-15a, miR-195, miR-23b i miR-142-3p estan sobreexpressats en el clúster de LCM amb IG no mutades i estan implicats en la promoció el creixement tumoral, la proliferació i la regulació de la supervivència. Per altra banda, s'ha proposat el miR-20b com a marcador de pronòstic en LCM, essent els casos que presenten baixa expressió d'aquests els de millor supervivència (Di et al., 2010).

La causa de desregulació dels miRs no es coneix exactament però podria ser deguda a alteracions en la dosi gènica o reordenaments pròxims als loci dels miRs (Calin & Croce, 2006; Lamy et al., 2006; Wang et al., 2008a). En el nostre treball vam observar una correlació significativa entre els elevats nivells del miR madur i el guany en la dosi gènica només en els miRs localitzats a 8q24 (miR-30d), 11q13 (miR-139), 13q31 (miR17-3p, miR17-5p, miR-18, miR-19a i miR-20a) i 18q21 (miR-122a). La relació dels miRs madurs del clúster miR-17-92 es va mantenir després de la correcció per tests múltiples. En un estudi recent, es va demostrar que el gen precursor d'aquest clúster (c13orf25) és l'únic gen inclòs a la regió mínima amplificada (13q31) en LCM i els seus elevats nivells d'expressió es relacionaven amb amplificació de la regió (Bea et al., 2009). La sobreexpressió de miRs associats a aquesta amplificació gènica també s'ha observat en limfoma de Burkitt i el limfoma difús de cèl·lules grans, indicant que podria ser un mecanisme important en la patogènesi d'aquest grup de limfomes agressius (Ota et al., 2004; Tagawa et al., 2005; Tagawa & Seto, 2005). El paper oncogènic del clúster miR-17-92 ja ha estat descrit anteriorment i podria estar implicat en diversos mecanismes, incloent la cooperació amb *MYC* induint una disminució de l'apoptosi (Coller et al., 2007; He et al., 2005; Matsubara et al., 2007). Per altra banda, la desregulació de *MYC* ha estat reconeguda com un factor pronòstic important en LCM (Hartmann et al., 2008). En el nostre estudi de *MYC* i els miR-17-5p i miR-20a en 50 mostres addicionals de LCM ganglionars vam demostrar que els tumors amb elevada expressió concomitant de *MYC* i el clúster miR-17-92 s'associava a supervivència curta, suggerint la implicació d'aquesta cooperació en la progressió tumoral dels LCM.

Per altra banda, es van observar diferències en els nivells d'expressió entre mostres leucèmiques i ganglionars que podrien ser degudes a la contaminació per cèl·lules no neoplàsiques. No obstant, el miR-337 no es va detectar en cap mostra tumoral, però sí en el *pool* de ganglis reactius, indicant que el grau de contaminació de les mostres ganglionars no era suficient per a la detecció d'aquest miR. Per determinar si les diferències eren degudes a la localització topogràfica del tumor, es van purificar mostres simultànies de sang i gangli de dos pacients, de la comparació dels quals en van resultar 11 microRNAs diferencialment expressats, suggerint una possible modulació del desenvolupament tumoral deguda a l'efecte del microambient. La idea de que l'expressió dels miRs està regulada per compartiments cel·lulars està recolzada per un estudi d'expressió de miRs en LLC, en els quals l'expressió de BIC/pri-miR-155 era major en cèl·lules de centres de proliferació, mentre que el miR-150 s'expressava principalment en cèl·lules en repòs de LLC (Wang et al., 2008a).

Un estudi recent (Iqbal et al., 2012) demostra la presència de subgrups de LCM ganglionars relacionats amb supervivència en funció del perfil d'expressió de miRs, recolzant el que es descriu en aquesta tesi. El perfil d'expressió de miRs també ens podria donar una idea de la cèl·lula putativa d'origen en LCM, degut a l'associació de l'expressió d'alguns miRs amb poblacions de cèl·lules B normals. Per exemple, els miR-150, miR-29c, miR-101, miR-223, miR-320 han estat descrits enriquits en cèl·lules B *naïve* (Malumbres et al., 2009; Zhang et al., 2009), algun d'aquests amb una funció de manteniment de l'estat quiescent en òrgans limfoides perifèrics. L'expressió del miR-223 en cèl·lules B *naïve* bloqueja la diferenciació d'aquestes cap a cèl·lules del CG per repressió de LMO2 i MYBL1 (Malumbres et al., 2009; Zhang et al., 2009). De manera similar, el miR-150 controla l'expansió de les cèl·lules B1, així com la resposta immune humoral en ratolins mitjançant la unió al factor de transcripció MYB (Xiao et al., 2007). Di Lisio *i col.* (Di et al., 2010) postulen que els LCM (sense fer distincions entre subgrups) presenten baixa expressió de miRs relacionats amb la signatura de CG (incloent BCL6, LMO2, SERPIN9 i GCET2) tot i que Iqbal *i col.* (Iqbal et al., 2012) demostren que un subgrup de LCM altament proliferants associats a l'expressió del clúster miR-17-92 i els seus homòlegs miR-106a-363 i miR-106b-25, presenten un perfil de miRs més semblants a cèl·lules del CG que no a cèl·lules B *naïve*.

En termes generals, els casos de LCM *end of the spectrum* presenten una correlació inversa entre l'estat mutacional de les IG i l'expressió de SOX11. El 81% dels LCM corresponen a aquests casos, 59% amb IG no mutades i SOX11 positius i 22% amb IG mutades i SOX11 negatius, mentre que el 19% restant dels casos quedaria fora d'aquesta classificació. Segons l'anàlisi de supervivència (Figura 24A) els únics casos que es podrien considerar clínicament indolents correspondrien als casos que presenten IG mutades i sense expressió de SOX11. Els altres tres grups no presenten diferències a nivell de supervivència i tots tenen un comportament clínic semblant al dels LCM convencionals. L'estudi de les característiques patològiques i moleculars, també demostra que el clúster de mostres IG mutades i SOX11 negatiu correspon a un grup a part (Figura 24B).

Un cop definida i corroborada una possible estratificació dels pacients, la següent qüestió és com procedir al tractament d'aquests, que no és d'abordatge senzill, ja que no hi ha encara una evidència prospectiva. La simple observació ha demostrat ser factible en pacients asimptomàtics, igual a com es procedeix en desordres limfoproliferatius indolents (Martin et al., 2009; Orchard et al., 2003). No obstant, no hi ha res disponible que es pugui comparar al tractament actiu, per altra banda, molts metges especialistes no es troben còmodes davant de la idea de no tractar un pacient de LCM degut a l'agressivitat que s'associa a aquest tumor.

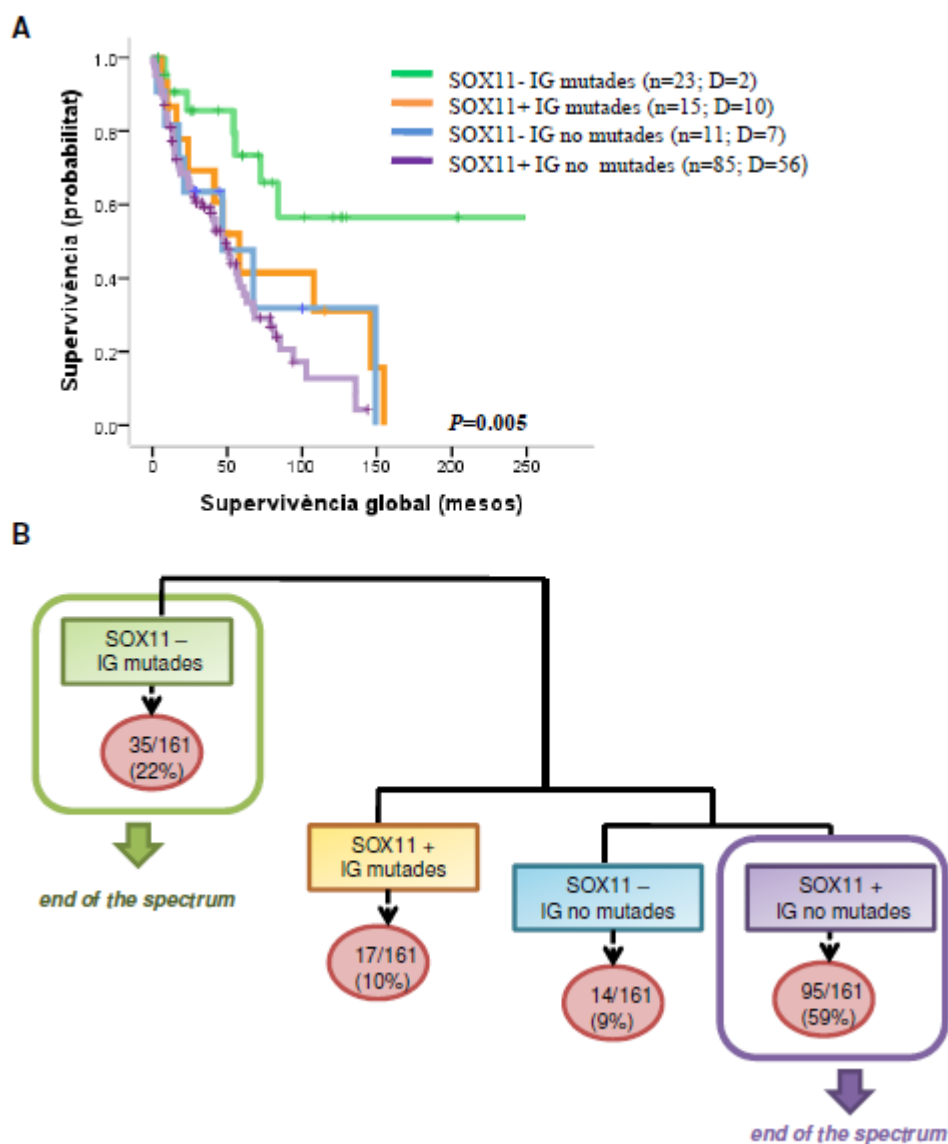


Figura 24. A) Corba Kaplan-Meier d'estimació de la supervivència global dels pacients de LCM en funció de l'estat mutacional de les IG (mutat vs. no mutat) i l'expressió concomitant de SOX11 (positiu vs. negatiu). Pacients amb IG mutades (97% d'identitat) i negatius per SOX11 mostraven millor supervivència que qualsevol altre grup. B) Clúster dels casos en funció de les característiques patològiques i moleculars (morfologia, ki67, complexitat genòmica i alteracions a 17p/UPD o mutacions en *TP53*), clíniques (edat, sexe, limfadenopaties, esplenomegàlia, LDH, estadi i MIPI) i de supervivència (necessitat de tractament, resposta completa i supervivència als 5 anys).

La immunoteràpia només amb rituximab o la immunoquimioteràpia són altres possibilitats acceptables. En principi, la intensificació amb transplantaments autòlegs o al·logènics de cèl·lules mare s'hauria d'evitar en primera línia per pacients amb pronòstic favorable. Per últim, és molt important el seguiment d'aquests pacients, sobretot establir una política de “vigilància i espera” (Martin & Leonard, 2011), per estar alerta davant una possible transformació en relació a la deleció de 17p. En aquesta situació, el tractament immediat estaria plenament justificat.

Per concloure, els estudis d'aquesta tesi, proporcionen un coneixement multidisciplinari integrant l'estudi dels gens de les IG en una sèrie llarga de pacients de LCM i l'expressió de SOX11 i determinats miRs, que identifica dos subtipus de pacients d'aquesta neoplàsia amb diferents característiques moleculars i genètiques, diferent presentació clínica i evolució de la malaltia, i que de manera interessant sembla que s'originen a partir de diferents subpoblacions de cèl·lules limfoides.

“Una cosa es pensar que se está en el buen camino, y la otra que este camino es el único. De todas maneras, todo son maneras.”

(Anònim)

6. CONCLUSIONS

1. El repertori de les immunoglobulines en el LCM està esbiaixat. L'ús restringit i conservat de determinades famílies de gens IGHV i la distribució no aleatòria de les mutacions somàtiques, concentrades principalment en IGHV4-59 i IGHV3-23, planteja la possibilitat de que els progenitors, d'almenys una fracció important dels casos, responen selectivament a determinats antigens, indicant que els processos de selecció i resposta antigènica podrien ser mecanismes de limfomagènesis i estar implicats en la patogènesis i l'evolució d'aquesta neoplàsia.
2. Les observacions en cèl·lules normals, autoreactives i clons de cèl·lules B malignes suggereixen que inclús una baixa càrrega mutacional pot ser funcionalment rellevant, per això adoptem un enfocament diferent al plantejat en articles anteriors, considerant 4 grups mutacionals; no mutats, mínimament mutats, significativament mutats i hipermutats, essent el 97% el millor llinar de càrrega mutacional que separa dos subgrups de LCM en funció de la supervivència.
3. L'anàlisi exhaustiu del BcR ha modificat els punts del vista sobre la potencial cèl·lula d'origen del LCM. Segons els perfils d'expressió els LCM amb IG mutades presenten sobreexpressió d'una signatura de cèl·lula B de memòria, mentre que els casos de LCM amb IG no mutades estan enriquits amb una signatura de cèl·lula B *naïve*.
4. La majoria dels casos de LCM presenta una correlació inversa entre l'estat mutacional de les IG i l'expressió de SOX11. El 59% dels LCM són SOX11 positius amb IG no mutades associats a un mal pronòstic, el 22% dels LCM són SOX11 negatius amb IG mutades i de comportament clínic indolent, mentre que el 19% dels casos restants no presenten aquesta correlació inversa i tenen una supervivència com la dels casos LCM convencionals.
5. L'estudi de l'expressió de *SOX11*, *HDGFRP3* i *DBN1* per qPCR demostra que aquests gens es poden utilitzar com a signatura per distingir entre LCM indolents i convencionals en mostres leucèmiques de LCM. La signatura es pot utilitzar com a marcador molecular i de pronòstic de la malaltia, sent els casos LCM no ganglionars amb baixa expressió per aquest gens, els de millor pronòstic.

6. L'estat de 17p/*TP53* podria ser indicatiu de transformació de la neoplàsia cap a formes més agressives en pacients inicialment de bon pronòstic (*SOX11* negatiu amb IG mutades). L'avaluació de les alteracions en aquest loci de manera rutinària, podria ser important per afinar les estratègies de maneig clínic dels pacients.
7. Els nivells d'expressió de microRNAs en LCM són inferiors en relació a les cèl·lules limfoides normals. Segons els perfils d'expressió dels miRs, es poden distingir dos subgrups de tumors que difereixen en l'estat mutacional de les IG, la complexitat genòmica i els nivells de proliferació.
8. La desregulació dels miRs no sembla estar relacionada amb els canvis en el número de còpia gènica dels locus cromosòmics, només els nivells del miR-17-5p i miR-20a, inclosos en el clúster miR17-92, estan significativament associats a amplificacions de 13q31. A més, l'elevada expressió concomitant de *MYC* i del clúster miR17-92, està associada a LCM amb un comportament més agressiu.
9. Tant l'anàlisi del BcR, l'expressió de *SOX11* i el perfil d'expressió de microRNAs, demostren la presència d'almenys dos subgrups de pacients amb característiques biològiques i moleculars determinades, suggerint la presència de dos subtipus de LCM amb comportament i presentació clínic molt diferent.
10. Degut al comportament clínic indolent associat als casos *SOX11* negatiu amb IG mutades i a que no existeix cap evidència clara de que el tractament influeixi en la supervivència a llarg termini d'aquests, seria interessant adoptar una estratègia de "vigilància i espera".

7. ANNEXES

Annex 1. Enviat a Cancer Research. Agost 2012**Sorafenib inhibits cell migration and stroma-mediated bortezomib resistance by interfering BCR signaling and protein translation in mantle cell lymphoma**

Xargay S, López-Guerra M, Saborit-Villarroya I, Rosich L, Navarro A, Montraveta A, Pérez-Galán P, Roué G, Campo E, Colomer D.

Mantle cell lymphoma (MCL) is an incurable and aggressive B-cell neoplasm. Here, we provide first evidence on the molecular mechanism of action of the multikinase inhibitor sorafenib in this entity. Both in cell lines and primary cells, sorafenib induces a rapid dephosphorylation of the BCR-associated tyrosine kinases, Syk and Lyn, as well as the Infrastream Src target, the focal adhesion kinase (FAK). In this line, we demonstrate a strong synergy when combining sorafenib with the Syk inhibitor, R406. In parallel, we show that sorafenib also blocks Mcl-1 and cyclin D1 at translational level, which promotes an unbalance between pro- and anti-apoptotic proteins and facilitates the release of Bax from cyclin D1, finally leading to the induction of the mitochondrial apoptotic pathway and the activation of caspase-dependent and independent factors. Moreover, sorafenib inhibits MCL cell migration as well as actin polymerization in response to CXCL12. FAK knockInfra partially prevents this inhibitory effect, thus indicating that FAK is a relevant target for sorafenib action in MCL cells. Importantly, this compound resensitizes MCL cells cultured with stroma to bortezomib-induced apoptosis. All these results suggest that sorafenib, alone or in combination with bortezomib-based therapies, may represent a promising approach to treat MCL patients. diagnostic tool for NSCLC. Our results show therefore that the causal role and value of EML4-ALK as a therapeutic target remain to be defined.

Contribució: anàlisi per PCR i seqüenciació dels gens de les IG.

Annex 2. Modern Pathology. Maig 2012 doi:10.1038/modpathol.2012.84**Increased tumor cell proliferation in mantle cell lymphoma is associated with elevated IMP3 protein expression**

Hartmann E, Beà S, Navarro A, Trapp V, Campo E, Ott G, Rosenwald A.

Mantle cell lymphoma (MCL) is an aggressive, non-curable B cell lymphoma, characterized by the translocation t(11,14)(q13;q32) involving *Cyclin D1* and a high number of additional genetic alterations. Chromosomal gains of 7p are frequent in MCL, with Insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 3 (*IGF2BP3* aka IMP3) being the most upregulated gene in this region. IMP3 is a member of the IGF II mRNA binding protein family, and increased IMP3 expression is associated with an aggressive behavior in many malignant tumors. We here analyze selected genes related to insulin growth factor (IGF) signaling in gene expression and genomic array data of 8 MCL cell lines and 12 primary MCL and study IMP3 protein expression in 172 well characterized primary MCL by immunohistochemistry. The majority of MCL cell lines and primary cases showed elevated IMP3 mRNA expression and a subset also expressed the IGF1- and IGF2-receptors. On the protein level, 66 of 172 primary MCL showed IMP3 expression in >50% of tumor cells, and strong IMP3 protein expression was highly associated with increased proliferation as measured by the Ki-67 index, but not with overall survival of MCL patients. Only a subset of MCL with marked IMP3 expression had an underlying chromosomal gain in 7p suggesting that additional mechanisms are involved in the upregulation of IMP3 in MCL. In seven paired MCL samples, IMP3 protein expression remained constant between primary diagnosis and relapse. Increased IMP3 expression and, potentially, enhanced IGF signaling may contribute proliferative stimuli in the evolution of MCL tumor cells and pharmacologic intervention with the IGF pathway could represent an additional future treatment option in this lymphoma.

Contribució: selecció de mostres de Barcelona i recollida de dades clíniques i moleculars. Col·laboració en l'anàlisi.

Annex 3. Genes, Chromosome and Cancer. Epub 2012 May 23. 2012 Sep;51(9):881-9.

Different distribution of NOTCH1 mutations in chronic lymphocytic leukemia with isolated trisomy 12 or associated with other chromosomal alterations

López C, Delgado J, Costa D, Conde L, Ghita G, Villamor N, Navarro A, Cazorla M, Gómez, Arias A, Muñoz, Baumann T, Rozman M, Aymerich M, Colomer D, Cobo, F, Campo E, López-Guillermo A, Montserrat E, Carrió A.

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common leukemia among adults in Western countries. Chromosomal abnormalities commonly found using conventional cytogenetics and FISH are del(11)(q22-23), trisomy 12, del(13)(q14) and del(17)(p13). Trisomy 12 is the most frequent numerical abnormality in CLL. It can appear isolated or associated with other chromosomal aberrations, including t(14;18)(q32;q21) and trisomy 18. The aim of this study was to determine whether CLL patients with isolated trisomy 12 or associated with other chromosomal alterations have different clinico-pathological features, including a different distribution *NOTCH1* mutation. Patients were classified into four groups: group 1, isolated trisomy 12 (n=14); group 2, trisomy 12 plus trisomy 18 (n=4); group 3, trisomy 12 plus t(14;18) (n=8) and group 4: patients with trisomy 12 plus other abnormalities not involving *BCL2* (n=28). The Binet stage and expression of *ZAP70* were significantly different among cytogenetic groups. *NOTCH1* mutations were detected in 6/12 (50%) patients from group 1, 4/25 (16%) patients from group 4, and in no patient from groups 2 and 3 (P = 0.020). Patients in group 2 had a more rapid disease progression (median Treatment-free Survival 2 months) as against patients from groups 1 (50 months), 3 (69 months) or 4 (68 months) (p = 0.001). These findings indicate that the distribution of *NOTCH1* mutations in CLL with trisomy 12 is heterogeneous and that the presence of additional chromosomal abnormalities such as trisomy 18 could change the prognosis of these patients.

Contribució: anàlisi per PCR i seqüenciació dels gens de les IG.

Annex 4. Br J Haematol. 2012 Març;156(5):612-8**A new genetic abnormality leading to TP53 gene deletion in chronic lymphocytic leukaemia**

López C, Baumann T, Costa D, López-Guerra M, Navarro A, Gómez C, Arias A, Muñoz C, Rozman M, Villamor N, Colomer D, Montserrat E, Campo E, Carrió A.

The analysis of chromosomal abnormalities provides significant prognostic information in patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL), a disease with a highly heterogeneous clinical course. Chromosomal abnormalities commonly found are trisomy 12, del(13)(q14), del(11)(q22-23), del(17)(p13) and del(6)(q21). Translocations are present in some patients and affect regions recurrently involved in CLL. This report describes the clinical and pathological characteristics of four CLL patients showing a new recurrent chromosomal abnormality dic(8;17)(p11;p11), that implied loss of the TP53 gene in all cases. In addition, TP53 gene was mutated in three out of four patients. Mechanically, Low Copy Repeats (LCR) in 17p12 and 8p11 may explain the origin of the translocation by non-allelic homologous recombination (NAHR). Isolated dic(8;17)(p11;p11) in patients with mutated IGHV genes status may not have the same prognostic impact as other mutations or deletions affecting the TP53 gene. Larger series are needed to better evaluate the clinical impact of this chromosomal aberration during the course of the disease.

Contribució: anàlisi per PCR i seqüenciació de l'estat mutacional de *TP53*.

Annex 5. Blood. 2011 Set 15;118(11):3088-95.**Is there a role for antigen selection in mantle cell lymphoma? Immunogenetic support from a series of 807 cases**

Hadzidimitriou A, Agathangelidis A, Darzentas N, Murray F, Delfau-Larue MH, Pedersen LB, Navarro A, Dagklis A, Rombout P, Beldjord K, Kolstad A, Dreyling MH, Anagnostopoulos A, Tsaftaris A, Mavragani-Tsipidou P, Rosenwald A, Ponzoni M, Groenen P, Ghia P, Sander B, Papadaki T, Campo E, Geisler C, Rosenquist R, Davi F, Pott C, Stamatopoulos K.

We examined 807 productive IGHV-IGHD-IGHJ gene rearrangements from mantle cell lymphoma (MCL) cases, by far the largest series to date. The IGHV gene repertoire was remarkably biased, with IGHV3-21, IGHV4-34, IGHV1-8, and IGHV3-23 accounting for 46.3% of the cohort. Eighty-four of 807 (10.4%) cases, mainly using the IGHV3-21 and IGHV4-34 genes, were found to bear stereotyped heavy complementarity-determining region 3 (VH CDR3) sequences and were placed in 38 clusters. Notably, the MCL stereotypes were distinct from those reported for chronic lymphocytic leukemia. Based on somatic hypermutation (SHM) status, 238/807 sequences (29.5%) carried IGHV genes with 100% germ line identity; the remainder (569/807; 70.5%) exhibited different SHM impact, ranging from minimal (in most cases) to pronounced. Shared replacement mutations across the IGHV gene were identified for certain subgroups, especially those using IGHV3-21, IGHV1-8, and IGHV3-23. Comparison with other entities, in particular CLL, revealed that several of these mutations were "MCL-biased." In conclusion, MCL is characterized by a highly restricted immunoglobulin gene repertoire with stereotyped VH CDR3s and very precise SHM targeting, strongly implying a role for antigen-driven selection of the clonogenic progenitors. Hence, an antigen-driven origin of MCL could be envisaged, at least for subsets of cases.

Contribució: selecció de casos i anàlisi de l'estat mutacional dels gens de les IGH dels casos de Barcelona. Estada de dos mesos a Grècia amb col·laboració amb el grup de l'últim firmant.

Annex 6. PLoS One. 2011;6(5):e19736.**Identification of methylated genes associated with aggressive clinicopathological features in mantle cell lymphoma**

Enjuanes A, Fernández V, Hernández L, **Navarro A**, Beà S, Pinyol M, López-Guillermo A, Rosenwald A, Ott G, Campo E, Jares P.

Background: Mantle cell lymphoma (MCL) is genetically characterized by the t(11;14)(q13;q32) translocation and a high number of secondary chromosomal alterations. The contribution of DNA methylation to MCL lymphomagenesis is not well known. We sought to identify epigenetically silenced genes in these tumours that might have clinical relevance. **Methodology/principal findings:** To identify potential methylated genes in MCL we initially investigated seven MCL cell lines treated with epigenetic drugs and gene expression microarray profiling. The methylation status of selected candidate genes was validated by a quantitative assay and subsequently analyzed in a series of primary MCL (n=38). After pharmacological reversion we identified 252 potentially methylated genes. The methylation analysis of a subset of these genes (n=25) in the MCL cell lines and normal B lymphocytes confirmed that 80% of them were methylated in the cell lines but not in normal lymphocytes. The subsequent analysis in primary MCL identified five genes (SOX9, HOXA9, AHR, NR2F2, and ROBO1) frequently methylated in these tumours. The gene methylation events tended to occur in the same primary neoplasms and correlated with higher proliferation, increased number of chromosomal abnormalities, and shorter survival of the patients. **Conclusions:** We have identified a set of genes whose methylation degree and gene expression levels correlate with aggressive clinicopathological features of MCL. Our findings also suggest that a subset of MCL might show a CpG island methylator phenotype (CIMP) that may influence the behaviour of the tumours.

Contribució: selecció de casos, extracció d'RNA i DNA, caracterització molecular (anàlisi de *TP53*, *IGHV* i altres alteracions genètiques) i recollida de dades clíniques.

Annex 7. Cancer Res. 2010 Feb 15;70(4):1408-18.**Genomic and gene expression profiling defines indolent forms of mantle cell lymphoma**

Fernández V, Salameo O, Espinet B, Solé F, Royo C, **Navarro A**, Camacho F, Beà S, Hartmann E, Amador V, Hernández L, Agostinelli C, Sargent RL, Rozman M, Aymerich M, Colomer D, Villamor N, Swerdlow SH, Pileri SA, Bosch F, Piris MA, Montserrat E, Ott G, Rosenwald A, López-Guillermo A, Jares P, Serrano S, Campo E.

Mantle cell lymphoma (MCL) is typically a very aggressive disease with poor outcomes, but some cases display an indolent behavior that might not necessitate treatment at diagnosis. To define molecular criteria that might permit recognition of such cases, we compared the clinicopathologic features, gene expression, and genomic profile of patients who had indolent or conventional disease (iMCL or cMCL). Patients with iMCL displayed nonnodal leukemic disease with predominantly hypermutated IGVH and noncomplex karyotypes. iMCL and cMCL shared a common gene expression profile that differed from other leukemic lymphoid neoplasms. However, we identified a signature of 13 genes that was highly expressed in cMCL but underexpressed in iMCL. SOX11 was notable in this signature and we confirmed a restriction of SOX11 protein expression to cMCL. To validate the potential use of SOX11 as a biomarker for cMCL, we evaluated SOX11 protein expression in an independent series of 112 cases of MCL. Fifteen patients with SOX11-negative tumors exhibited more frequent nonnodal presentation and better survival compared with 97 patients with SOX11-positive MCL (5-year overall survival of 78% versus 36%, respectively; $P = 0.001$). In conclusion, we defined nonnodal presentation, predominantly hypermutated IGVH, lack of genomic complexity, and absence of SOX11 expression as qualities of a specific subtype of iMCL with excellent outcomes that might be managed more conservatively than cMCL.

Contribució: col·laboració en l'anàlisi de microarrays d'expressió i SNP-arrays. Anàlisi de l'estat mutacional de les IG i *TP53*.

Annex 8. Blood. 2009 Març 26;113(13):3059-69.**Uniparental disomies, homozygous deletions, amplifications and target genes in mantle cell lymphoma revealed by integrative high-resolution whole genome profiling**

Bea S, Salaverria I, Armengol L, Pinyol M, Fernandez V, Hartmann EM, Jares P, Amador V, Hernandez L, **Navarro A**, Ott G, Rosenwal A, Estivill X, Campo E.

Mantle cell lymphoma (MCL) is genetically characterized by the t(11;14)(q13;q32) translocation and a high number of secondary chromosomal alterations. However, only a limited number of target genes have been identified. We have studied 10 MCL cell lines and 28 primary tumors with a combination of a high-density single-nucleotide polymorphism array and gene expression profiling. We detected highly altered genomes in the majority of the samples with a high number of partial uniparental disomies (UPDs). The UPD at 17p was one of the most common, and it was associated with TP53 gene inactivation. Homozygous deletions targeted 4 known tumor suppressor genes (CDKN2C, BCL2L11, CDKN2A, and RB1) and 6 new genes (FAF1, MAP2, SP100, MOBKL2B, ZNF280A, and PRAME). Gene amplification coupled with overexpression was identified in 35 different regions. The most recurrent amplified regions were 11q13.3-q13.5, 13q31.3, and 18q21.33, which targeted CCND1, C13orf25, and BCL2, respectively. Interestingly, the breakpoints flanking all the genomic alterations, including UPDs, were significantly associated with genomic regions enriched in copy number variants and segmental duplications, suggesting that the recombination at these regions may play a role in the genomic instability of MCL. This integrative genomic analysis has revealed target genes that may be potentially relevant in MCL pathogenesis.

Contribució: col·laboració en l'anàlisi dels SNP-arrays, correlació amb els perfils d'expressió i validacions per qPCR.

Annex 9. Am J Pathol. 2009 Feb;174(2):661-70.**EML4-ALK rearrangement in non-small cell lung cancer and non-tumor lung tissues**

Martelli MP, Sozzi G, Hernandez L, Pettirossi V, **Navarro A**, Conte D, Gasparini P, Perrone F, Modena P, Pastorino U, Carbone A, Fabbri A, Sidoni A, Nakamura S, Gambacorta M, Fernández PL, Ramirez J, Chan JK, Grigioni WF, Campo E, Pileri SA, Falini B.

A fusion gene, echinoderm microtubule associated protein like 4-anaplastic lymphoma kinase (EML4-ALK), with transforming activity has recently been identified in a subset of non-small cell lung cancer (NSCLC), but its pathogenetic, diagnostic, and therapeutic roles remain unclear. Both frequency and type of EML4-ALK transcripts were investigated by reverse transcription PCR in 120 frozen NSCLC specimens from Italy and Spain; non-neoplastic lung tissues taken far from the tumor were used as controls. In cases carrying the fusion transcript, we determined EML4-ALK gene and protein levels using fluorescence in situ hybridization, Western blotting, and immunoprecipitation. We also analyzed ALK protein levels in paraffin samples from 662 NSCLC specimens, including the 120 cases investigated in the molecular studies. EML4-ALK transcripts (variants 1 and 3) were detected in 9 of 120 NSCLC samples but were not specific for NSCLC since they were also found in non-cancerous lung tissues taken far from the tumor. Notably, no transcripts were detected in matching tumor samples from these patients. Fluorescence in situ hybridization analysis of cases expressing EML4-ALK transcripts showed that only a minority of cells harbored the EML4-ALK gene. None of these cases was found to express the EML4-ALK protein as examined by immunohistochemistry, Western blotting, and immunoprecipitation. The EML4-ALK transcript cannot be regarded as a specific diagnostic tool for NSCLC. Our results show therefore that the causal role and value of EML4-ALK as a therapeutic target remain to be defined.

Contribució: estudi molecular per qPCR de la presència de la translocació EML4-ALK

Publicacions com a membre del Consorci Internacional del Genoma del Càncer per l'estudi de la leucèmia limfàtica crònica(ICGC-CLL):

Annex 10. Acceptat a Nature Genetics. Abril 2012.

Integrative whole-genome epigenomic analysis reveals widespread gene body DNA hypomethylation with functional and clinical impact in chronic lymphocytic leukemia

Kulis M, Heath S, Bibikova M, Queirós A, **Navarro A**, Clot G, Martínez-Trillos A, Brun-Heath I, Pinyol M, Barberán-Soler S, Papasaikas P, Jares P, Beà S, Rico D, Ecker S, Ho V, Klotzle B, Castellano G, Hernández L, Conde L, López-Guerra M, Colomer D, Villamor N, Aymerich M, Rozman M, Bayes M, Gut M, Quesada V, Puente X.S, Pisano D.G, Valencia A, López-Guillermo A, Gut I, López-Otín C, Campo E & Martín-Subero J.I.

The epigenomic landscape of chronic lymphocytic leukemia (CLL), the most common leukemia in adults, is still poorly characterized. Here, we have extensively characterized the DNA methylome of 139 CLLs with mutated or unmutated *IGHV* as well as several mature B cell subpopulations using whole-genome bisulfite sequencing and high-density microarrays. The two molecular subtypes of CLL have a different DNA methylome, which seems to represent an epigenetic imprint of distinct normal B cell types. DNA hypomethylation in the gene body was the most frequent change between naive and memory B cells and in the two molecular subtypes of CLL as compared to normal B cells. The global expression profile of CLL was poorly related to DNA methylation. However, we identified 911 genes in which gene body differential methylation was negatively or positively associated with expression levels, and these regions were highly enriched in enhancer sites. We have also recognized a DNA methylation signature that distinguishes new subtypes of CLL with different biological features and clinical behavior. We propose an epigenomic scenario in which differential methylation in the gene body plays a major role in leukemogenesis, with both functional and clinical implications.

Contribució: estudi molecular per PCR i anàlisi de l'estat mutacional dels gens de les IG de 139 casos.

Annex 11. Nat Genet. 2011 Des 11;44(1):47-52**Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia**

Quesada V, Conde L, Villamor N, Ordóñez GR, Jares P, Bassaganyas L, Ramsay AJ, Beà S, Pinyol M, Martínez-Trillos A, López-Guerra M, Colomer D, **Navarro A**, Baumann T, Aymerich M, Rozman M, Delgado J, Giné E, Hernández JM, González-Díaz M, Puente DA, Velasco G, Freije JM, Tubío JM, Royo R, Gelpí JL, Orozco M, Pisano DG, Zamora J, Vázquez M, Valencia A, Himmelbauer H, Bayés M, Heath S, Gut M, Gut I, Estivill X, López-Guillermo A, Puente XS, Campo E, López-Otín C.

Here we perform whole-exome sequencing of samples from 105 individuals with chronic lymphocytic leukemia (CLL), the most frequent leukemia in adults in Western countries. We found 1,246 somatic mutations potentially affecting gene function and identified 78 genes with predicted functional alterations in more than one tumor sample. Among these genes, SF3B1, encoding a subunit of the spliceosomal U2 small nuclear ribonucleoprotein (snRNP), is somatically mutated in 9.7% of affected individuals. Further analysis in 279 individuals with CLL showed that SF3B1 mutations were associated with faster disease progression and poor overall survival. This work provides the first comprehensive catalog of somatic mutations in CLL with relevant clinical correlates and defines a large set of new genes that may drive the development of this common form of leukemia. The results reinforce the idea that targeting several well-known genetic pathways, including mRNA splicing, could be useful in the treatment of CLL and other malignancies.

Contribució: estudi molecular per PCR i anàlisi de l'estat mutacional dels gens de les IG de 384 casos.

Annex 12. Nature. 2011 Jun 5;475(7354):101-5.**Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia**

Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordóñez GR, Villamor N, Escaramis G, Jares P, Beà S, González-Díaz M, Bassaganyas L, Baumann T, Juan M, López-Guerra M, Colomer D, Tubío JM, López C, **Navarro A**, Tornador C, Aymerich M, Rozman M, Hernández JM, Puente DA, Freije JM, Velasco G, Gutiérrez-Fernández A, Costa D, Carrió A, Gujjarro S, Enjuanes A, Hernández L, Yagüe J, Nicolás P, Romeo-Casabona CM, Himmelbauer H, Castillo E, Dohm JC, de Sanjosé S, Piris MA, de Alava E, San Miguel J, Royo R, Gelpí JL, Torrents D, Orozco M, Pisano DG, Valencia A, Guigó R, Bayés M, Heath S, Gut M, Klatt P, Marshall J, Raine K, Stebbings LA, Futreal PA, Stratton MR, Campbell PJ, Gut I, López-Guillermo A, Estivill X, Montserrat E, López-Otín C, Campo E.

Chronic lymphocytic leukaemia (CLL), the most frequent leukaemia in adults in Western countries, is a heterogeneous disease with variable clinical presentation and evolution. Two major molecular subtypes can be distinguished, characterized respectively by a high or low number of somatic hypermutations in IGHV genes. The molecular changes leading to the pathogenesis of the disease are still poorly understood. Here we performed whole-genome sequencing of four cases of CLL and identified 46 somatic mutations that potentially affect gene function. Further analysis of these mutations in 363 patients with CLL identified four genes that are recurrently mutated: NOTCH1, XPO1, MYD88 and KLHL6. Mutations in MYD88 and KLHL6 are predominant in cases of CLL with mutated immunoglobulin genes, whereas NOTCH1 and XPO1 mutations are mainly detected in patients with unmutated immunoglobulins. The patterns of somatic mutation, supported by functional and clinical analyses, strongly indicate that the recurrent NOTCH1, MYD88 and XPO1 mutations are oncogenic changes that contribute to the clinical evolution of the disease. To our knowledge, this is the first comprehensive analysis of CLL combining whole-genome sequencing with clinical characteristics and clinical outcomes. It highlights the usefulness of this approach for the identification of clinically relevant mutations in cancer.

Contribució: estudi molecular per PCR i anàlisi de l'estat mutacional dels gens de les IG de 367 casos

8. BIBLIOGRAFIA

- Aarts WM, Willemze R, Bende RJ, Meijer CJ, Pals ST, & van Noesel CJ VH gene analysis of primary cutaneous B-cell lymphomas: evidence for ongoing somatic hypermutation and isotype switching. *Blood* 92: 3857-3864.1998.
- Agathangelidis A, Hadzidimitriou A, Rosenquist R, & Stamatopoulos K Unlocking the secrets of immunoglobulin receptors in mantle cell lymphoma: implications for the origin and selection of the malignant cells. *Semin Cancer Biol* 21: 299-307.2011.
- Allen JE, Hough RE, Goepel JR, Bottomley S, Wilson GA, Alcock HE, Baird M, Lorigan PC, Vandenberghe EA, Hancock BW, & Hammond DW Identification of novel regions of amplification and deletion within mantle cell lymphoma DNA by comparative genomic hybridization. *Br J Haematol* 116: 291-298.2002.
- Allman D & Pillai S Peripheral B cell subsets. *Curr Opin Immunol* 20: 149-157.2008.
- Angelopoulou MK, Siakantariz MP, Vassilakopoulos TP, Kontopidou FN, Rassidakis GZ, Dimopoulou MN, Kittas C, & Pangalis GA The splenic form of mantle cell lymphoma. *Eur J Haematol* 68: 12-21.2002.
- Ansell SM, Inwards DJ, Rowland KM, Jr., Flynn PJ, Morton RF, Moore DF, Jr., Kaufmann SH, Ghobrial I, Kurtin PJ, Maurer M, Allmer C, & Witzig TE Low-dose, single-agent temsirolimus for relapsed mantle cell lymphoma: a phase 2 trial in the North Central Cancer Treatment Group. *Cancer* 113: 508-514.2008.
- Bea S, Ribas M, Hernandez JM, Bosch F, Pinyol M, Hernandez L, Garcia JL, Flores T, Gonzalez M, Lopez-Guillermo A, Piris MA, Cardesa A, Montserrat E, Miro R, & Campo E Increased number of chromosomal imbalances and high-level DNA amplifications in mantle cell lymphoma are associated with blastoid variants. *Blood* 93: 4365-4374.1999.
- Bea S, Salaverria I, Armengol L, Pinyol M, Fernandez V, Hartmann EM, Jares P, Amador V, Hernandez L, Navarro A, Ott G, Rosenwald A, Estivill X, & Campo E Uniparental disomies, homozygous deletions, amplifications, and target genes in mantle cell lymphoma revealed by integrative high-resolution whole-genome profiling. *Blood* 113: 3059-3069.2009.

- Bergsland M, Werme M, Malewicz M, Perlmann T, & Muhr J The establishment of neuronal properties is controlled by Sox4 and Sox11. *Genes Dev* 20: 3475-3486.2006.
- Bikos V, Darzentas N, Hadzidimitriou A, Davis Z, Hockley S, Traverse-Glehen A, Algara P, Santoro A, Gonzalez D, Mollejo M, Dagklis A, Gangemi F, Bosler DS, Bourikas G, Anagnostopoulos A, Tsaftaris A, Iannitto E, Ponzoni M, Felman P, Berger F, Belessi C, Ghia P, Papadaki T, Dogan A, Degano M, Matutes E, Piris MA, Oscier D, & Stamatopoulos K Over 30% of patients with splenic marginal zone lymphoma express the same immunoglobulin heavy variable gene: ontogenetic implications. *Leukemia* doi: 10.1038/leu.2012.3.2012.
- Blenk S, Engelmann JC, Pinkert S, Weniger M, Schultz J, Rosenwald A, Muller-Hermelink HK, Muller T, & Dandekar T Explorative data analysis of MCL reveals gene expression networks implicated in survival and prognosis supported by explorative CGH analysis. *BMC Cancer* 8: 106.2008.
- Brezinschek HP, Foster SJ, Brezinschek RI, Dorner T, Domiati-Saad R, & Lipsky PE Analysis of the human VH gene repertoire. Differential effects of selection and somatic hypermutation on human peripheral CD5(+)/IgM+ and CD5(-)/IgM+ B cells. *J Clin Invest* 99: 2488-2501.1997.
- Brochet X, Lefranc MP, & Giudicelli V IMGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis. *Nucleic Acids Res* 36: W503-W508.2008.
- Budde LE, Guthrie KA, Till BG, Press OW, Chauncey TR, Pagel JM, Petersdorf SH, Bensinger WI, Holmberg LA, Shustov AR, Green DJ, Maloney DG, & Gopal AK Mantle cell lymphoma international prognostic index but not pretransplantation induction regimen predicts survival for patients with mantle-cell lymphoma receiving high-dose therapy and autologous stem-cell transplantation. *J Clin Oncol* 29: 3023-3029.2011.
- Calin GA & Croce CM MicroRNAs and chromosomal abnormalities in cancer cells. *Oncogene* 25: 6202-6210.2006.

- Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di LG, Shimizu M, Wojcik SE, Iorio MV, Visone R, Sever NI, Fabbri M, Iuliano R, Palumbo T, Pichiorri F, Roldo C, Garzon R, Sevignani C, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, & Croce CM A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 353: 1793-1801.2005.
- Calin GA, Liu CG, Sevignani C, Ferracin M, Felli N, Dumitru CD, Shimizu M, Cimmino A, Zupo S, Dono M, Dell'Aquila ML, Alder H, Rassenti L, Kipps TJ, Bullrich F, Negrini M, & Croce CM MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 11755-11760.2004a.
- Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, & Croce CM Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 2999-3004.2004b.
- Camacho E, Hernandez L, Hernandez S, Tort F, Bellosillo B, Bea S, Bosch F, Montserrat E, Cardesa A, Fernandez PL, & Campo E ATM gene inactivation in mantle cell lymphoma mainly occurs by truncating mutations and missense mutations involving the phosphatidylinositol-3 kinase domain and is associated with increasing numbers of chromosomal imbalances. *Blood* 99: 238-244.2002.
- Camacho FI, Algara P, Rodriguez A, Ruiz-Ballesteros E, Mollejo M, Martinez N, Martinez-Climent JA, Gonzalez M, Mateo M, Caleo A, Sanchez-Beato M, Menarguez J, Garcia-Conde J, Sole F, Campo E, & Piris MA Molecular heterogeneity in MCL defined by the use of specific VH genes and the frequency of somatic mutations. *Blood* 101: 4042-4046.2003.
- Campo E, Raffeld M & Jaffe ES Mantle-cell lymphoma. *Semin Hematol.* 1999 Apr;36(2):115-27.
- Chang SS, Jiang WW, Smith I, Poeta LM, Begum S, Glazer C, Shan S, Westra W, Sidransky D, & Califano JA MicroRNA alterations in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 123: 2791-2797.2008.

- Chen CZ, Li L, Lodish HF, & Bartel DP MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 303: 83-86.2004.
- Chen YH, Gao J, Fan G, & Peterson LC Nuclear expression of sox11 is highly associated with mantle cell lymphoma but is independent of t(11;14)(q13;q32) in non-mantle cell B-cell neoplasms. *Mod Pathol* 23: 105-112.2010.
- Cheung M, bu-Elmagd M, Clevers H, & Scotting PJ Roles of Sox4 in central nervous system development. *Brain Res Mol Brain Res* 79: 180-191.2000.
- Chiorazzi N & Ferrarini M Cellular origin(s) of chronic lymphocytic leukemia: cautionary notes and additional considerations and possibilities. *Blood* 117: 1781-1791.2011.
- Christian B, Zhao W, Hamadani M, Sotomayor EM, Navarro W, Devine SM, Racke F, & Blum KA Mantle cell lymphoma 12 years after allogeneic bone marrow transplantation occurring simultaneously in recipient and donor. *J Clin Oncol* 28: e629-e632.2010.
- Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, & Croce CM miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 13944-13949.2005.
- Cogliatti SB, Bertoni F, Zimmermann DR, Henz S, Diss TC, Ghielmini M, & Schmid U IgV H mutations in blastoid mantle cell lymphoma characterize a subgroup with a tendency to more favourable clinical outcome. *J Pathol* 206: 320-327.2005.
- Coller HA, Forman JJ, & Legesse-Miller A "Myc'ed messages": myc induces transcription of E2F1 while inhibiting its translation via a microRNA polycistron. *PLoS Genet* 3: e146.2007.
- Croce CM, Shander M, Martinis J, Cicurel L, D'Ancona GG, Dolby TW, & Koprowski H Chromosomal location of the genes for human immunoglobulin heavy chains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 3416-3419.1979.

- de Oliveira JC, Scrideli CA, Brassesco MS, Morales AG, Pezuk JA, Queiroz RP, Yunes JA, Brandalise SR, & Tone LG Differential miRNA expression in childhood acute lymphoblastic leukemia and association with clinical and biological features. *Leuk Res* 36: 293-298.2012.
- de Vinuesa CG, Cook MC, Ball J, Drew M, Sunners Y, Cascalho M, Wabl M, Klaus GG, & MacLennan IC Germinal centers without T cells. *J Exp Med* 191: 485-494.2000.
- Di LL, Gomez-Lopez G, Sanchez-Beato M, Gomez-Abad C, Rodriguez ME, Villuendas R, Ferreira BI, Carro A, Rico D, Mollejo M, Martinez MA, Menarguez J, az-Alderete A, Gil J, Cigudosa JC, Pisano DG, Piris MA, & Martinez N Mantle cell lymphoma: transcriptional regulation by microRNAs. *Leukemia* 24: 1335-1342.2010.
- Dictor M, Ek S, Sundberg M, Warenholt J, Gyorgy C, Sernbo S, Gustavsson E, bu-Alsoud W, Wadstrom T, & Borrebaeck C Strong lymphoid nuclear expression of SOX11 transcription factor defines lymphoblastic neoplasms, mantle cell lymphoma and Burkitt's lymphoma. *Haematologica* 94: 1563-1568.2009.
- Doench JG & Sharp PA Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev* 18: 504-511.2004.
- Dorshkind,K. & Rawlings,D.J. (2005) B cell development. (Abstract).*Hemathology Basic Principles and Practice 4rt edition*, 119-134.
- Dreyling M, Lenz G, Hoster E, Van Hoof A, Gisselbrecht C, Schmits R, Metzner B, Truemper L, Reiser M, Steinhauer H, Boiron JM, Boogaerts MA, Aldaoud A, Silingardi V, Kluin-Nelemans HC, Hasford J, Parwaresch R, Unterhalt M, & Hiddemann W Early consolidation by myeloablative radiochemotherapy followed by autologous stem cell transplantation in first remission significantly prolongs progression-free survival in mantle-cell lymphoma: results of a prospective randomized trial of the European MCL Network. *Blood* 105: 2677-2684.2005.

- Dy P, Penzo-Mendez A, Wang H, Pedraza CE, Macklin WB, & Lefebvre V The three SoxC proteins--Sox4, Sox11 and Sox12--exhibit overlapping expression patterns and molecular properties. *Nucleic Acids Res* 36: 3101-3117.2008.
- Efremov DG, Ivanovski M, Batista FD, Pozzato G, & Burrone OR IgM-producing chronic lymphocytic leukemia cells undergo immunoglobulin isotype-switching without acquiring somatic mutations. *J Clin Invest* 98: 290-298.1996.
- Eis PS, Tam W, Sun L, Chadburn A, Li Z, Gomez MF, Lund E, & Dahlberg JE Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 3627-3632.2005.
- Ek S, Dictor M, Jerkeman M, Jirstrom K, & Borrebaeck CA Nuclear expression of the non B-cell lineage Sox11 transcription factor identifies mantle cell lymphoma. *Blood* 111: 800-805.2008.
- Espinet B, Salaverria I, Bea S, Ruiz-Xiville N, Balague O, Salido M, Costa D, Carreras J, Rodriguez-Vicente AE, Luis GJ, Hernandez-Rivas JM, Calasanz MJ, Siebert R, Ferrer A, Salar A, Carrio A, Polo N, Garcia-Marco JA, Domingo A, Gonzalez-Barca E, Romagosa V, Marugan I, Lopez-Guillermo A, Milla F, Luis MJ, Luno E, Sanzo C, Collado R, Oliver I, Monzo S, Palacin A, Gonzalez T, Sant F, Salinas R, Ardanaz MT, Font L, Escoda L, Florensa L, Serrano S, Campo E, & Sole F Incidence and prognostic impact of secondary cytogenetic aberrations in a series of 145 patients with mantle cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 49: 439-451.2010.
- Espinet B, Sole F, Pedro C, Garcia M, Bellosillo B, Salido M, Florensa L, Camacho FI, Baro T, Lloreta J, & Serrano S Clonal proliferation of cyclin D1-positive mantle lymphocytes in an asymptomatic patient: an early-stage event in the development or an indolent form of a mantle cell lymphoma? *Hum Pathol* 36: 1232-1237.2005.
- Evans LS & Hancock BW Non-Hodgkin lymphoma. *Lancet* 362: 139-146.2003.
- Eve HE, Furtado MV, Hamon MD, & Rule SA Time to treatment does not influence overall survival in newly diagnosed mantle-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 27: e189-e190.2009.

- Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S, Sellars B, Valetto A, Allen SL, Schulman P, Vinciguerra VP, Rai K, Rassenti LZ, Kipps TJ, Dighiero G, Schroeder HW, Jr., Ferrarini M, & Chiorazzi N Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J Clin Invest* 102: 1515-1525.1998.
- Fernandez V, Salamero O, Espinet B, Sole F, Royo C, Navarro A, Camacho F, Bea S, Hartmann E, Amador V, Hernandez L, Agostinelli C, Sargent RL, Rozman M, Aymerich M, Colomer D, Villamor N, Swerdlow SH, Pileri SA, Bosch F, Piris MA, Montserrat E, Ott G, Rosenwald A, Lopez-Guillermo A, Jares P, Serrano S, & Campo E Genomic and gene expression profiling defines indolent forms of mantle cell lymphoma. *Cancer Res* 70: 1408-1418.2010.
- Ferrer A, Salaverria I, Bosch F, Villamor N, Rozman M, Bea S, Gine E, Lopez-Guillermo A, Campo E, & Montserrat E Leukemic involvement is a common feature in mantle cell lymphoma. *Cancer* 109: 2473-2480.2007.
- Foran JM, Rohatiner AZ, Cunningham D, Popescu RA, Solal-Celigny P, Ghielmini M, Coiffier B, Johnson PW, Gisselbrecht C, Reyes F, Radford JA, Bessell EM, Souleau B, Benzohra A, & Lister TA European phase II study of rituximab (chimeric anti-CD20 monoclonal antibody) for patients with newly diagnosed mantle-cell lymphoma and previously treated mantle-cell lymphoma, immunocytoma, and small B-cell lymphocytic lymphoma. *J Clin Oncol* 18: 317-324.2000.
- Foster SJ, Brezinschek HP, Brezinschek RI, & Lipsky PE Molecular mechanisms and selective influences that shape the kappa gene repertoire of IgM+ B cells. *J Clin Invest* 99: 1614-1627.1997.
- Fu K, Weisenburger DD, Greiner TC, Dave S, Wright G, Rosenwald A, Chiorazzi M, Iqbal J, Gesk S, Siebert R, De JD, Jaffe ES, Wilson WH, Delabie J, Ott G, Dave BJ, Sanger WG, Smith LM, Rimsza L, Braziel RM, Muller-Hermelink HK, Campo E, Gascoyne RD, Staudt LM, & Chan WC Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study based on gene expression profiling. *Blood* 106: 4315-4321.2005.

- Furtado M & Rule S Indolent mantle cell lymphoma. *Haematologica* 96: 1086-1088.2011.
- Geisler CH, Kolstad A, Laurell A, Andersen NS, Pedersen LB, Jerkeman M, Eriksson M, Nordstrom M, Kimby E, Boesen AM, Kuittinen O, Lauritzsen GF, Nilsson-Ehle H, Ralfkiaer E, Akerman M, Ehinger M, Sundstrom C, Langholm R, Delabie J, Karjalainen-Lindsberg ML, Brown P, & Elonen E Long-term progression-free survival of mantle cell lymphoma after intensive front-line immunochemotherapy with in vivo-purged stem cell rescue: a nonrandomized phase 2 multicenter study by the Nordic Lymphoma Group. *Blood* 112: 2687-2693.2008.
- Gelebart P, Anand M, Armanious H, Peters AC, Dien BJ, Amin HM, & Lai R Constitutive activation of the Wnt canonical pathway in mantle cell lymphoma. *Blood* 112: 5171-5179.2008.
- Georgantas RW, III, Hildreth R, Morisot S, Alder J, Liu CG, Heimfeld S, Calin GA, Croce CM, & Civin CI CD34+ hematopoietic stem-progenitor cell microRNA expression and function: a circuit diagram of differentiation control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 2750-2755.2007.
- Gesk S, Klapper W, Martin-Subero JI, Nagel I, Harder L, Fu K, Bernd HW, Weisenburger DD, Parwaresch R, & Siebert R A chromosomal translocation in cyclin D1-negative/cyclin D2-positive mantle cell lymphoma fuses the CCND2 gene to the IGK locus. *Blood* 108: 1109-1110.2006.
- Greiner TC, Moynihan MJ, Chan WC, Lytle DM, Pedersen A, Anderson JR, & Weisenburger DD p53 mutations in mantle cell lymphoma are associated with variant cytology and predict a poor prognosis. *Blood* 87: 4302-4310.1996.
- Gustavsson E, Sernbo S, Andersson E, Brennan DJ, Dictor M, Jerkeman M, Borrebaeck CA, & Ek S SOX11 expression correlates to promoter methylation and regulates tumor growth in hematopoietic malignancies. *Mol Cancer* 9: 187.2010.
- Guzman-Rojas L, Sims-Mourtada JC, Rangel R, & Martinez-Valdez H Life and death within germinal centres: a double-edged sword. *Immunology* 107: 167-175.2002.

- Ha I, Wightman B, & Ruvkun G A bulged lin-4/lin-14 RNA duplex is sufficient for *Caenorhabditis elegans* lin-14 temporal gradient formation. *Genes Dev* 10: 3041-3050.1996.
- Habermann TM, Lossos IS, Justice G, Vose JM, Wiernik PH, McBride K, Wride K, Ervin-Haynes A, Takeshita K, Pietronigro D, Zeldis JB, & Tuscano JM Lenalidomide oral monotherapy produces a high response rate in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *Br J Haematol* 145: 344-349.2009.
- Hadzidimitriou A, Agathangelidis A, Darzentas N, Murray F, fau-Larue MH, Bredo PL, Navarro LA, Dagklis A, Rombout P, Beldjord K, Kolstad A, Dreyling MH, Anagnostopoulos A, Tsaftaris A, Mavragani-Tsipidou P, Rosenwald A, Ponzoni M, Groenen P, Ghia P, Sander B, Papadaki T, Campo E, Geisler C, Rosenquist R, Davi F, Pott C, & Stamatopoulos K Is there a role for antigen selection in mantle cell lymphoma? Immunogenetic support from a series of 807 cases. *Blood* 118: 3088-3095.2011.
- Halldorsdottir AM, Lundin A, Murray F, Mansouri L, Knuutila S, Sundstrom C, Laurell A, Ehrencrona H, Sander B, & Rosenquist R Impact of TP53 mutation and 17p deletion in mantle cell lymphoma. *Leukemia* 25: 1904-1908.2011a.
- Halldorsdottir AM, Sander B, Goransson H, Isaksson A, Kimby E, Mansouri M, Rosenquist R, & Ehrencrona H High-resolution genomic screening in mantle cell lymphoma--specific changes correlate with genomic complexity, the proliferation signature and survival. *Genes Chromosomes Cancer* 50: 113-121.2011b.
- Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, & Stevenson FK Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94: 1848-1854.1999.
- Harel S, Delarue R, Ribrag V, Dreyling M, & Hermine O Treatment of younger patients with mantle cell lymphoma. *Semin Hematol* 48: 194-207.2011.
- Hargrave M, Wright E, Kun J, Emery J, Cooper L, & Koopman P Expression of the Sox11 gene in mouse embryos suggests roles in neuronal maturation and epithelio-mesenchymal induction. *Dev Dyn* 210: 79-86.1997.

- Hartley SB, Cooke MP, Fulcher DA, Harris AW, Cory S, Basten A, & Goodnow CC Elimination of self-reactive B lymphocytes proceeds in two stages: arrested development and cell death. *Cell* 72: 325-335.1993.
- Hartmann E, Fernandez V, Moreno V, Valls J, Hernandez L, Bosch F, Abrisqueta P, Klapper W, Dreyling M, Hoster E, Muller-Hermelink HK, Ott G, Rosenwald A, & Campo E Five-gene model to predict survival in mantle-cell lymphoma using frozen or formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *J Clin Oncol* 26: 4966-4972.2008.
- Hartmann EM, Campo E, Wright G, Lenz G, Salaverria I, Jares P, Xiao W, Braziel RM, Rimsza LM, Chan WC, Weisenburger DD, Delabie J, Jaffe ES, Gascoyne RD, Dave SS, Mueller-Hermelink HK, Staudt LM, Ott G, Bea S, & Rosenwald A Pathway discovery in mantle cell lymphoma by integrated analysis of high-resolution gene expression and copy number profiling. *Blood* 116: 953-961.2010.
- He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, Powers S, Cordon-Cardo C, Lowe SW, Hannon GJ, & Hammond SM A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 435: 828-833.2005.
- Hernandez L, Fest T, Cazorla M, Teruya-Feldstein J, Bosch F, Peinado MA, Piris MA, Montserrat E, Cardesa A, Jaffe ES, Campo E, & Raffeld M p53 gene mutations and protein overexpression are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas. *Blood* 87: 3351-3359.1996.
- Hess J, Herbrecht R, Romaguera J, Verhoef G, Crump M, Gisselbrecht C, Laurell A, Offner F, Strahs A, Berkenblit A, Hanushevsky O, Clancy J, Hewes D, Moore L, & Coiffier B Phase III study to evaluate temsirolimus compared with investigator's choice therapy for the treatment of relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol* 27: 3822-3829.2009.
- Hide T, Takezaki T, Nakatani Y, Nakamura H, Kuratsu J, & Kondo T Sox11 prevents tumorigenesis of glioma-initiating cells by inducing neuronal differentiation. *Cancer Res* 69: 7953-7959.2009.

- Honma K, Tsuzuki S, Nakagawa M, Tagawa H, Nakamura S, Morishima Y, & Seto M TNFAIP3/A20 functions as a novel tumor suppressor gene in several subtypes of non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 114: 2467-2475.2009.
- Hoster E, Dreyling M, Klapper W, Gisselbrecht C, Van HA, Kluin-Nelemans HC, Pfreundschuh M, Reiser M, Metzner B, Einsele H, Peter N, Jung W, Wormann B, Ludwig WD, Dührsen U, Eimermacher H, Wandt H, Hasford J, Hiddemann W, & Unterhalt M A new prognostic index (MIPI) for patients with advanced-stage mantle cell lymphoma. *Blood* 111: 558-565.2008.
- Hutter G, Scheubner M, Zimmermann Y, Kalla J, Katzenberger T, Hubler K, Roth S, Hiddemann W, Ott G, & Dreyling M Differential effect of epigenetic alterations and genomic deletions of CDK inhibitors [p16(INK4a), p15(INK4b), p14(ARF)] in mantle cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 45: 203-210.2006.
- Hystad ME, Myklebust JH, Bo TH, Sivertsen EA, Rian E, Forfang L, Munthe E, Rosenwald A, Chiorazzi M, Jonassen I, Staudt LM, & Smeland EB Characterization of early stages of human B cell development by gene expression profiling. *J Immunol* 179: 3662-3671.2007.
- Inghirami G, Foitl DR, Sabichi A, Zhu BY, & Knowles DM Autoantibody-associated cross-reactive idiotype-bearing human B lymphocytes: distribution and characterization, including Ig VH gene and CD5 antigen expression. *Blood* 78: 1503-1515.1991.
- Iqbal J, Shen Y, Liu Y, Fu K, Jaffe ES, Liu C, Liu Z, Lachel CM, Deffenbacher K, Greiner TC, Vose JM, Bhagavathi S, Staudt LM, Rimsza L, Rosenwald A, Ott G, Delabie J, Campo E, Braziel RM, Cook JR, Tubbs RR, Gascoyne RD, Armitage JO, Weisenburger DD, McKeithan TW, & Chan WC Genome-wide MicroRNA profiling of mantle cell lymphoma reveal a distinct subgroup with poor prognosis. *Blood*.2012.
- Jaffe ES, Harris NL, Stein H, & Isaacson PG Classification of lymphoid neoplasms: the microscope as a tool for disease discovery. *Blood* 112: 4384-4399.2008.
- Jares P & Campo E Advances in the understanding of mantle cell lymphoma. *Br J Haematol* 142: 149-165.2008.

- Jares P, Colomer D, & Campo E Genetic and molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: perspectives for new targeted therapeutics. *Nat Rev Cancer* 7: 750-762.2007.
- Jay P, Goze C, Marsollier C, Taviaux S, Hardelin JP, Koopman P, & Berta P The human SOX11 gene: cloning, chromosomal assignment and tissue expression. *Genomics* 29: 541-545.1995.
- Johnson TA, Rassenti LZ, & Kipps TJ Ig VH1 genes expressed in B cell chronic lymphocytic leukemia exhibit distinctive molecular features. *J Immunol* 158: 235-246.1997.
- Kawamata N, Ogawa S, Gueller S, Ross SH, Huynh T, Chen J, Chang A, Nabavi-Nouis S, Megrabian N, Siebert R, Martinez-Climent JA, & Koeffler HP Identified hidden genomic changes in mantle cell lymphoma using high-resolution single nucleotide polymorphism genomic array. *Exp Hematol* 37: 937-946.2009.
- Kienle D, Krober A, Katzenberger T, Ott G, Leupolt E, Barth TF, Moller P, Benner A, Habermann A, Muller-Hermelink HK, Bentz M, Lichter P, Dohner H, & Stilgenbauer S VH mutation status and VDJ rearrangement structure in mantle cell lymphoma: correlation with genomic aberrations, clinical characteristics, and outcome. *Blood* 102: 3003-3009.2003.
- Kimura Y, Sato K, Imamura Y, Arakawa F, Kiyasu J, Takeuchi M, Miyoshi H, Yoshida M, Niino D, Sugita Y, Morito T, Yoshino T, Nakamura S, & Ohshima K Small cell variant of mantle cell lymphoma is an indolent lymphoma characterized by bone marrow involvement, splenomegaly, and a low Ki-67 index. *Cancer Sci.*2011.
- Kirsch IR, Morton CC, Nakahara K, & Leder P Human immunoglobulin heavy chain genes map to a region of translocations in malignant B lymphocytes. *Science* 216: 301-303.1982.
- Kleinsteïn SH, Louzoun Y, & Shlomchik MJ Estimating hypermutation rates from clonal tree data. *J Immunol* 171: 4639-4649.2003.

- Kluiver J, Haralambieva E, De JD, Blokszijl T, Jacobs S, Kroesen BJ, Poppema S, & van den BA Lack of BIC and microRNA miR-155 expression in primary cases of Burkitt lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 45: 147-153.2006.
- Kohlhammer H, Schwaenen C, Wessendorf S, Holzmann K, Kestler HA, Kienle D, Barth TF, Moller P, Ott G, Kalla J, Radlwimmer B, Pscherer A, Stilgenbauer S, Dohner H, Lichter P, & Bentz M Genomic DNA-chip hybridization in t(11;14)-positive mantle cell lymphomas shows a high frequency of aberrations and allows a refined characterization of consensus regions. *Blood* 104: 795-801.2004.
- Kolar GR, Mehta D, Pelayo R, & Capra JD A novel human B cell subpopulation representing the initial germinal center population to express AID. *Blood* 109: 2545-2552.2007.
- Kopan R & Ilagan MX The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell*. 2009 Apr 17;137(2):216-33
- Kridel R, Meissner B, Rogic S, Boyle M, Telenius A, Woolcock B, Gunawardana J, Jenkins C, Cochrane C, Ben-Neriah S, Tan K, Morin RD, Opat S, Sehn LH, Connors JM, Marra MA, Weng AP, Steidl C, & Gascoyne RD Whole transcriptome sequencing reveals recurrent NOTCH1 mutations in mantle cell lymphoma. *Blood* 119: 1963-1971.2012.
- Lamy P, Andersen CL, Dyrskjot L, Topping N, Orntoft T, & Wiuf C Are microRNAs located in genomic regions associated with cancer? *Br J Cancer* 95: 1415-1418.2006.
- Lecluse Y, Lebailly P, Roulland S, Gac AC, Nadel B, & Gauduchon P t(11;14)-positive clones can persist over a long period of time in the peripheral blood of healthy individuals. *Leukemia* 23: 1190-1193.2009.
- Lee CJ, Appleby VJ, Orme AT, Chan WI, & Scotting PJ Differential expression of SOX4 and SOX11 in medulloblastoma. *J Neurooncol* 57: 201-214.2002.
- Lee RC, Feinbaum RL, & Ambros V The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75: 843-854.1993.

- Lefranc MP, Giudicelli V, Ginestoux C, Bodmer J, Muller W, Bontrop R, Lemaitre M, Malik A, Barbie V, & Chaume D IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res* 27: 209-212.1999.
- Lefranc MP, Giudicelli V, Ginestoux C, Jabado-Michaloud J, Folch G, Bellahcene F, Wu Y, Gemrot E, Brochet X, Lane J, Regnier L, Ehrenmann F, Lefranc G, & Duroux P IMGT, the international ImMunoGeneTics information system. *Nucleic Acids Res* 37: D1006-D1012.2009.
- Lefranc MP, Giudicelli V, Kaas Q, Duprat E, Jabado-Michaloud J, Scaviner D, Ginestoux C, Clement O, Chaume D, & Lefranc G IMGT, the international ImMunoGeneTics information system. *Nucleic Acids Res* 33: D593-D597.2005.
- Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, & Johnson JM Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 433: 769-773.2005.
- Liu YJ, de BO, & Fugier-Vivier I Mechanisms of selection and differentiation in germinal centers. *Curr Opin Immunol* 9: 256-262.1997.
- Louie DC, Offit K, Jaslow R, Parsa NZ, Murty VV, Schluger A, & Chaganti RS p53 overexpression as a marker of poor prognosis in mantle cell lymphomas with t(11;14)(q13;q32). *Blood* 86: 2892-2899.1995.
- Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, & Kutay U Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303: 95-98.2004.
- MacLennan IC Germinal centers. *Annu Rev Immunol* 12: 117-139.1994.
- Malumbres R, Sarosiek KA, Cubedo E, Ruiz JW, Jiang X, Gascoyne RD, Tibshirani R, & Lossos IS Differentiation stage-specific expression of microRNAs in B lymphocytes and diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 113: 3754-3764.2009.
- Manser T Textbook germinal centers? *J Immunol* 172: 3369-3375.2004.
- Martin P, Chadburn A, Christos P, Weil K, Furman RR, Ruan J, Elstrom R, Niesvizky R, Ely S, Diliberto M, Melnick A, Knowles DM, Chen-Kiang S, Coleman M, &

- Leonard JP Outcome of deferred initial therapy in mantle-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 27: 1209-1213.2009.
- Martin P & Leonard J Is there a role for "watch and wait" in patients with mantle cell lymphoma? *Semin Hematol* 48: 189-193.2011.
- Martinez-Climent JA, Vizcarra E, Sanchez D, Blesa D, Marugan I, Benet I, Sole F, Rubio-Moscardo F, Terol MJ, Climent J, Sarsotti E, Tormo M, Andreu E, Salido M, Ruiz MA, Prosper F, Siebert R, Dyer MJ, & Garcia-Conde J Loss of a novel tumor suppressor gene locus at chromosome 8p is associated with leukemic mantle cell lymphoma. *Blood* 98: 3479-3482.2001.
- Matsubara H, Takeuchi T, Nishikawa E, Yanagisawa K, Hayashita Y, Ebi H, Yamada H, Suzuki M, Nagino M, Nimura Y, Osada H, & Takahashi T Apoptosis induction by antisense oligonucleotides against miR-17-5p and miR-20a in lung cancers overexpressing miR-17-92. *Oncogene* 26: 6099-6105.2007.
- Maura F, Cutrona G, Fabris S, Colombo M, Tuana G, Agnelli L, Matis S, Lionetti M, Gentile M, Recchia AG, Di RF, Musolino C, Ilariucci F, Di RN, Pesce E, Molica S, Federico M, Cortelezzi A, Morabito F, Ferrarini M, & Neri A Relevance of stereotyped B-cell receptors in the context of the molecular, cytogenetic and clinical features of chronic lymphocytic leukemia. *PLoS One* 6: e24313.2011.
- McBride OW, Battey J, Hollis GF, Swan DC, Siebenlist U, & Leder P Localization of human variable and constant region immunoglobulin heavy chain genes on subtelomeric band q32 of chromosome 14. *Nucleic Acids Res* 10: 8155-8170.1982.
- Messmer BT, Albesiano E, Efremov DG, Ghiotto F, Allen SL, Kolitz J, Foa R, Damle RN, Fais F, Messmer D, Rai KR, Ferrarini M, & Chiorazzi N Multiple distinct sets of stereotyped antigen receptors indicate a role for antigen in promoting chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 200: 519-525.2004.
- Metzler M, Wilda M, Busch K, Viehmann S, & Borkhardt A High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 39: 167-169.2004.

- Milstein C, Neuberger MS, & Staden R Both DNA strands of antibody genes are hypermutation targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 8791-8794.1998.
- Monson NL, Foster SJ, Brezinschek HP, Brezinschek RI, Dorner T, & Lipsky PE The role of CD40-CD40 ligand (CD154) interactions in immunoglobulin light chain repertoire generation and somatic mutation. *Clin Immunol* 100: 71-81.2001.
- Morton LM, Wang SS, Devesa SS, Hartge P, Weisenburger DD, & Linet MS Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. *Blood* 107: 265-276.2006.
- Mozos A, Royo C, Hartmann E, De JD, Baro C, Valera A, Fu K, Weisenburger DD, Delabie J, Chuang SS, Jaffe ES, Ruiz-Marcellan C, Dave S, Rimsza L, Braziel R, Gascoyne RD, Sole F, Lopez-Guillermo A, Colomer D, Staudt LM, Rosenwald A, Ott G, Jares P, & Campo E SOX11 expression is highly specific for mantle cell lymphoma and identifies the cyclin D1-negative subtype. *Haematologica* 94: 1555-1562.2009.
- Murray F, Darzentas N, Hadzidimitriou A, Tobin G, Boudjogra M, Scielzo C, Laoutaris N, Karlsson K, Baran-Marzsak F, Tsaftaris A, Moreno C, Anagnostopoulos A, Caligaris-Cappio F, Vaur D, Ouzounis C, Belessi C, Ghia P, Davi F, Rosenquist R, & Stamatopoulos K Stereotyped patterns of somatic hypermutation in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia: implications for the role of antigen selection in leukemogenesis. *Blood* 111: 1524-1533.2008.
- National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a working formulation for clinical usage. The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project. *Cancer* 49: 2112-2135.1982.
- Nemazee D Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance. *Nat Rev Immunol* 6: 728-740.2006.
- Nodit L, Bahler DW, Jacobs SA, Locker J, & Swerdlow SH Indolent mantle cell lymphoma with nodal involvement and mutated immunoglobulin heavy chain genes. *Hum Pathol* 34: 1030-1034.2003.

- Nygren L, Baumgartner WS, Klimkowska M, Christensson B, Kimby E, & Sander B
Prognostic role of SOX11 in a population-based cohort of mantle cell lymphoma. *Blood* 119: 4215-4223.2012.
- O'Connell RM, Taganov KD, Boldin MP, Cheng G, & Baltimore D
MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 1604-1609.2007.
- O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, & Mendell JT
c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 435: 839-843.2005.
- Ondrejka SL, Lai R, Kumar N, Smith SD, & Hsi ED
Indolent mantle cell leukemia: clinicopathologic variant characterized by isolated lymphocytosis, interstitial bone marrow involvement, kappa light chain restriction, and good prognosis. *Haematologica* 96: 1121-1127.2011.
- Orchard J, Garand R, Davis Z, Babbage G, Sahota S, Matutes E, Catovsky D, Thomas PW, Vet-Loiseau H, & Oscier D
A subset of t(11;14) lymphoma with mantle cell features displays mutated IgVH genes and includes patients with good prognosis, nonnodal disease. *Blood* 101: 4975-4981.2003.
- Ota A, Tagawa H, Karnan S, Tsuzuki S, Karpas A, Kira S, Yoshida Y, & Seto M
Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma. *Cancer Res* 64: 3087-3095.2004.
- Ottensmeier CH, Thompsett AR, Zhu D, Wilkins BS, Sweetenham JW, & Stevenson FK
Analysis of VH genes in follicular and diffuse lymphoma shows ongoing somatic mutation and multiple isotype transcripts in early disease with changes during disease progression. *Blood* 91: 4292-4299.1998.
- Parry-Jones N, Matutes E, Morilla R, Brito-Babapulle V, Wotherspoon A, Swansbury GJ, & Catovsky D
Cytogenetic abnormalities additional to t(11;14) correlate with clinical features in leukaemic presentation of mantle cell lymphoma, and may influence prognosis: a study of 60 cases by FISH. *Br J Haematol* 137: 117-124.2007.

- Pekarsky Y, Santanam U, Cimmino A, Palamarchuk A, Efanov A, Maximov V, Volinia S, Alder H, Liu CG, Rassenti L, Calin GA, Hagan JP, Kipps T, & Croce CM Tcl1 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181. *Cancer Res* 66: 11590-11593.2006.
- Penzo-Mendez AI Critical roles for SoxC transcription factors in development and cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 42: 425-428.2010.
- Peponi E, Drakos E, Reyes G, Leventaki V, Rassidakis GZ, & Medeiros LJ Activation of mammalian target of rapamycin signaling promotes cell cycle progression and protects cells from apoptosis in mantle cell lymphoma. *Am J Pathol* 169: 2171-2180.2006.
- Perez-Galan P, Mora-Jensen H, Weniger MA, Shaffer AL, III, Rizzatti EG, Chapman CM, Mo CC, Stennett LS, Rader C, Liu P, Raghavachari N, Stetler-Stevenson M, Yuan C, Pittaluga S, Maric I, Dunleavy KM, Wilson WH, Staudt LM, & Wiestner A Bortezomib resistance in mantle cell lymphoma is associated with plasmacytic differentiation. *Blood* 117: 542-552.2010.
- Pichiorri F, Suh SS, Ladetto M, Kuehl M, Palumbo T, Drandi D, Taccioli C, Zanesi N, Alder H, Hagan JP, Munker R, Volinia S, Boccadoro M, Garzon R, Palumbo A, Aqeilan RI, & Croce CM MicroRNAs regulate critical genes associated with multiple myeloma pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 12885-12890.2008.
- Pillai S, Cariappa A, & Moran ST Marginal zone B cells. *Annu Rev Immunol* 23: 161-196.2005.
- Pinyol M, Bea S, Pla L, Ribrag V, Bosq J, Rosenwald A, Campo E, & Jares P Inactivation of RB1 in mantle-cell lymphoma detected by nonsense-mediated mRNA decay pathway inhibition and microarray analysis. *Blood* 109: 5422-5429.2007.
- Pinyol M, Hernandez L, Cazorla M, Balbin M, Jares P, Fernandez PL, Montserrat E, Cardesa A, Lopez-Otin C, & Campo E Deletions and loss of expression of p16INK4a and p21Waf1 genes are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas. *Blood* 89: 272-280.1997.

- Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordonez GR, Villamor N, Escaramis G, Jares P, Bea S, Gonzalez-Diaz M, Bassaganyas L, Baumann T, Juan M, Lopez-Guerra M, Colomer D, Tubio JM, Lopez C, Navarro A, Tornador C, Aymerich M, Rozman M, Hernandez JM, Puente DA, Freije JM, Velasco G, Gutierrez-Fernandez A, Costa D, Carrio A, Guijarro S, Enjuanes A, Hernandez L, Yague J, Nicolas P, Romeo-Casabona CM, Himmelbauer H, Castillo E, Dohm JC, de SS, Piris MA, de AE, San MJ, Royo R, Gelpi JL, Torrents D, Orozco M, Pisano DG, Valencia A, Guigo R, Bayes M, Heath S, Gut M, Klatt P, Marshall J, Raine K, Stebbings LA, Futreal PA, Stratton MR, Campbell PJ, Gut I, Lopez-Guillermo A, Estivill X, Montserrat E, Lopez-Otin C, & Campo E Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 475: 101-105.2011.
- Quintanilla-Martinez L, Slotta-Huspenina J, Koch I, Klier M, Hsi ED, de LL, Klapper W, Gesk S, Siebert R, & Fend F Differential diagnosis of cyclin D2+ mantle cell lymphoma based on fluorescence in situ hybridization and quantitative real-time-PCR. *Haematologica* 94: 1595-1598.2009.
- Racke,F., Simpson,S., Christian,B., Blum,K., Hasserjian,R., & Zhao,W. Evidence of long latency periods prior to development of mantle cell lymphoma. *52nd ASH Annual Meeting (abst. 323)*, San Diego, CA.2010.
- Rajewsky K Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 381: 751-758.1996.
- Richard P, Vassallo J, Valmary S, Missouri R, Delsol G & Brousset P "In situ-like" mantle cell lymphoma: a report of two cases. *J Clin Pathol.* 59(9):995-6.2006.
- Rinaldi A, Kwee I, Tadorelli M, Largo C, Uccella S, Martin V, Poretti G, Gaidano G, Calabrese G, Martinelli G, Baldini L, Pruneri G, Capella C, Zucca E, Cotter FE, Cigudosa JC, Catapano CV, Tibiletti MG, & Bertoni F Genomic and expression profiling identifies the B-cell associated tyrosine kinase Syk as a possible therapeutic target in mantle cell lymphoma. *Br J Haematol* 132: 303-316.2006.
- Rizzatti EG, Falcao RP, Panepucci RA, Proto-Siqueira R, Anselmo-Lima WT, Okamoto OK, & Zago MA Gene expression profiling of mantle cell lymphoma

- cells reveals aberrant expression of genes from the PI3K-AKT, WNT and TGFbeta signalling pathways. *Br J Haematol* 130: 516-526.2005.
- Rogozin IB & Diaz M Cutting edge: DGYW/WRCH is a better predictor of mutability at G:C bases in Ig hypermutation than the widely accepted RGYW/WRCY motif and probably reflects a two-step activation-induced cytidine deaminase-triggered process. *J Immunol* 172: 3382-3384.2004.
- Rogozin IB, Sredneva NE, & Kolchanov NA Somatic hypermutagenesis in immunoglobulin genes. III. Somatic mutations in the chicken light chain locus. *Biochim Biophys Acta* 1306: 171-178.1996.
- Romaguera JE, Fayad LE, Feng L, Hartig K, Weaver P, Rodriguez MA, Hagemester FB, Pro B, McLaughlin P, Younes A, Samaniego F, Goy A, Cabanillas F, Kantarjian H, Kwak L, & Wang M Ten-year follow-up after intense chemoimmunotherapy with Rituximab-HyperCVAD alternating with Rituximab-high dose methotrexate/cytarabine (R-MA) and without stem cell transplantation in patients with untreated aggressive mantle cell lymphoma. *Br J Haematol* 150: 200-208.2010.
- Rosenwald A, Wright G, Wiestner A, Chan WC, Connors JM, Campo E, Gascoyne RD, Grogan TM, Muller-Hermelink HK, Smeland EB, Chiorazzi M, Giltneane JM, Hurt EM, Zhao H, Averett L, Henrickson S, Yang L, Powell J, Wilson WH, Jaffe ES, Simon R, Klausner RD, Montserrat E, Bosch F, Greiner TC, Weisenburger DD, Sanger WG, Dave BJ, Lynch JC, Vose J, Armitage JO, Fisher RI, Miller TP, LeBlanc M, Ott G, Kvaloy S, Holte H, Delabie J, & Staudt LM The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma. *Cancer Cell* 3: 185-197.2003.
- Royo C, Salaverria I, Hartmann E, Rosenwald A, Campo E, & Bea S The complex landscape of genetic alterations in mantle cell lymphoma. *Semin Cancer Biol* 5: 322-334.2011.
- Rubio-Moscardo F, Climent J, Siebert R, Piris MA, Martin-Subero JI, Nielander I, Garcia-Conde J, Dyer MJ, Terol MJ, Pinkel D, & Martinez-Climent JA Mantle-

- cell lymphoma genotypes identified with CGH to BAC microarrays define a leukemic subgroup of disease and predict patient outcome. *Blood* 105: 4445-4454.2005.
- Rudelius M, Pittaluga S, Nishizuka S, Pham TH, Fend F, Jaffe ES, Quintanilla-Martinez L, & Raffeld M Constitutive activation of Akt contributes to the pathogenesis and survival of mantle cell lymphoma. *Blood* 108: 1668-1676.2006.
- Salaverria I, Zettl A, Bea S, Hartmann EM, Dave SS, Wright GW, Boerma EJ, Kluin PM, Ott G, Chan WC, Weisenburger DD, Lopez-Guillermo A, Gascoyne RD, Delabie J, Rimsza LM, Braziel RM, Jaffe ES, Staudt LM, Muller-Hermelink HK, Campo E, & Rosenwald A Chromosomal alterations detected by comparative genomic hybridization in subgroups of gene expression-defined Burkitt's lymphoma. *Haematologica* 93: 1327-1334.2008.
- Salaverria I, Zettl A, Bea S, Moreno V, Valls J, Hartmann E, Ott G, Wright G, Lopez-Guillermo A, Chan WC, Weisenburger DD, Gascoyne RD, Grogan TM, Delabie J, Jaffe ES, Montserrat E, Muller-Hermelink HK, Staudt LM, Rosenwald A, & Campo E Specific secondary genetic alterations in mantle cell lymphoma provide prognostic information independent of the gene expression-based proliferation signature. *J Clin Oncol* 25: 1216-1222.2007.
- Sant M, Allemani C, Tereanu C, De AR, Capocaccia R, Visser O, Marcos-Gragera R, Maynadie M, Simonetti A, Lutz JM, & Berrino F Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood* 116: 3724-3734.2010.
- Schilham MW, Oosterwegel MA, Moerer P, Ya J, de Boer PA, van de WM, Verbeek S, Lamers WH, Kruisbeek AM, Cumano A, & Clevers H Defects in cardiac outflow tract formation and pro-B-lymphocyte expansion in mice lacking Sox-4. *Nature* 380: 711-714.1996.
- Schraders M, Oeschger S, Kluin PM, Hebeda K, Schuurin E, Groenen PJ, Hansmann ML, & van Krieken JH Hypermethylation in mantle cell lymphoma does not indicate a clinical or biological subentity. *Mod Pathol* 22: 416-425.2009.

- Shiller SM, Zieske A, Holmes H, III, Feldman AL, Law ME, & Saad R CD5-positive, cyclinD1-negative mantle cell lymphoma with a translocation involving the CCND2 gene and the IGL locus. *Cancer Genet* 204: 162-164.2011.
- Smyth,G.K. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments., p. Article 3.2004.
- Stamatopoulos K, Kosmas C, Belessi C, Kyriazopoulos P, Papadaki T, Anagnostou D, & Loukopoulos D Molecular analysis of bcl-1/IgH junctional sequences in mantle cell lymphoma: potential mechanism of the t(11;14) chromosomal translocation. *Br J Haematol* 105: 190-197.1999.
- Stavnezer J Antibody class switching. *Adv Immunol* 61: 79-146.1996.
- Stevenson FK & Caligaris-Cappio F Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood* 103: 4389-4395.2004.
- Swerdlow,S., Campo,E., Harris,N., Jaffe,E., Pileri,S., Stein,H., Thiele,J., Vardiman,J., & (Eds.) (2008) *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*, Fourth Edition edn, Lyon.
- Szankasi P & Bahler DW Clinical laboratory analysis of immunoglobulin heavy chain variable region genes for chronic lymphocytic leukemia prognosis. *J Mol Diagn* 12: 244-249.2010.
- Tagawa H, Karnan S, Suzuki R, Matsuo K, Zhang X, Ota A, Morishima Y, Nakamura S, & Seto M Genome-wide array-based CGH for mantle cell lymphoma: identification of homozygous deletions of the proapoptotic gene BIM. *Oncogene* 24: 1348-1358.2005.
- Tagawa H & Seto M A microRNA cluster as a target of genomic amplification in malignant lymphoma. *Leukemia* 19: 2013-2016.2005.
- Tangye SG & Good KL. Human IgM+CD27+ B cells: memory B cells or "memory" B cells?. *J Immunol.* 1;179(1):13-9.2007.
- Thelander EF, Ichimura K, Collins VP, Walsh SH, Barbany G, Hagberg A, Laurell A, Rosenquist R, Larsson C, & Lagercrantz S Detailed assessment of copy number

- alterations revealing homozygous deletions in 1p and 13q in mantle cell lymphoma. *Leuk Res* 31: 1219-1230.2006.
- Thelander EF & Rosenquist R Molecular genetic characterization reveals new subsets of mantle cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 49: 1042-1049.2008.
- Thompsett AR, Ellison DW, Stevenson FK, & Zhu D V(H) gene sequences from primary central nervous system lymphomas indicate derivation from highly mutated germinal center B cells with ongoing mutational activity. *Blood* 94: 1738-1746.1999.
- van de WM, Oosterwegel M, van NK, & Clevers H Sox-4, an Sry-like HMG box protein, is a transcriptional activator in lymphocytes. *EMBO J* 12: 3847-3854.1993.
- van den BA, Kroesen BJ, Kooistra K, De JD, Briggs J, Blokzijl T, Jacobs S, Kluiver J, Diepstra A, Maggio E, & Poppema S High expression of B-cell receptor inducible gene BIC in all subtypes of Hodgkin lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 37: 20-28.2003.
- Vater I, Wagner F, Kreuz M, Berger H, Martin-Subero JI, Pott C, Martinez-Climent JA, Klapper W, Krause K, Dyer MJ, Gesk S, Harder L, Zamo A, Dreyling M, Hasenclever D, Arnold N, & Siebert R GeneChip analyses point to novel pathogenetic mechanisms in mantle cell lymphoma. *Br J Haematol* 144: 317-331.2009.
- Vegliante MC, Royo C, Palomero J, Salaverria I, Balint B, Martin-Guerrero I, Agirre X, Lujambio A, Richter J, Xargay-Torrent S, Bea S, Hernandez L, Enjuanes A, Calasanz MJ, Rosenwald A, Ott G, Roman-Gomez J, Prosper F, Esteller M, Jares P, Siebert R, Campo E, Martin-Subero JI, & Amador V Epigenetic activation of SOX11 in lymphoid neoplasms by histone modifications. *PLoS One* 6: e21382.2011.
- Volinia S, Galasso M, Sana ME, Wise TF, Palatini J, Huebner K, & Croce CM Breast cancer signatures for invasiveness and prognosis defined by deep sequencing of microRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 3024-3029.2012.

- Wang M, Tan LP, Dijkstra MK, van LK, Robertus JL, Harms G, Blokzijl T, Kooistra K, van T'veer MB, Rosati S, Visser L, Jongen-Lavrencic M, Kluin PM, & van den BA miRNA analysis in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: proliferation centres characterized by low miR-150 and high BIC/miR-155 expression. *J Pathol* 215: 13-20.2008a.
- Wang X, Asplund AC, Porwit A, Flygare J, Smith CI, Christensson B, & Sander B The subcellular Sox11 distribution pattern identifies subsets of mantle cell lymphoma: correlation to overall survival. *Br J Haematol* 143: 248-252.2008b.
- Weigle B, Ebner R, Temme A, Schwind S, Schmitz M, Kiessling A, Rieger MA, Schackert G, Schackert HK, & Rieber EP Highly specific overexpression of the transcription factor SOX11 in human malignant gliomas. *Oncol Rep* 13: 139-144.2005.
- Weller S, Braun MC, Tan BK, Rosenwald A, Cordier C, Conley ME, Plebani A, Kumararatne DS, Bonnet D, Tournilhac O, Tchernia G, Steiniger B, Staudt LM, Casanova JL, Reynaud CA, & Weill JC Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood* 104: 3647-3654.2004.
- Weller S, Faili A, Garcia C, Braun MC, Le Deist FF, de Saint Basile GG, Hermine O, Fischer A, Reynaud CA, & Weill JC CD40-CD40L independent Ig gene hypermutation suggests a second B cell diversification pathway in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 1166-1170.2001.
- Weng AP, Ferrando AA, Lee W, Morris JP, Silverman LB, Sanchez-Irizarry C, Blacklow SC, Look AT, & Aster JC Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* 306: 269-271.2004.
- Widhopf GF & Kipps TJ Normal B cells express 51p1-encoded Ig heavy chains that are distinct from those expressed by chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Immunol* 166: 95-102.2001.
- Wightman B, Ha I, & Ruvkun G Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75: 855-862.1993.

- Wlodarska I, Dierickx D, Vanhentenrijk V, Van RK, Pospisilova H, Minnei F, Verhoef G, Thomas J, Vandenberghe P, & De Wolf-Peeters C Translocations targeting CCND2, CCND3, and MYCN do occur in t(11;14)-negative mantle cell lymphomas. *Blood* 111: 5683-5690.2008.
- Wu YC, Kipling D, Leong HS, Martin V, Ademokun AA, & Dunn-Walters DK High-throughput immunoglobulin repertoire analysis distinguishes between human IgM memory and switched memory B-cell populations. *Blood* 116: 1070-1078.2010.
- Xiao C, Calado DP, Galler G, Thai TH, Patterson HC, Wang J, Rajewsky N, Bender TP, & Rajewsky K MiR-150 controls B cell differentiation by targeting the transcription factor c-Myb. *Cell* 131: 146-159.2007.
- Yu K, Taghva A, & Lieber MR The cleavage efficiency of the human immunoglobulin heavy chain VH elements by the RAG complex: implications for the immune repertoire. *J Biol Chem* 277: 5040-5046.2002.
- Zhang J, Jima DD, Jacobs C, Fischer R, Gottwein E, Huang G, Lugar PL, Lagoo AS, Rizzieri DA, Friedman DR, Weinberg JB, Lipsky PE, & Dave SS Patterns of microRNA expression characterize stages of human B-cell differentiation. *Blood* 113: 4586-4594.2009.

9. GLOSSARI I ANGLICISMES

Agressiu: tipus de tumor que es caracteritza per tenir un elevat índex proliferatiu, augment de la disseminació cel·lular i pitjor pronòstic. Dit quan els símptomes s'intensifiquen de forma brusca.

Aminoàcid: Substància orgànica que té almenys una funció d'àcid carboxílic (-COOH) i una funció amina (-NH₂) i que forma part de les proteïnes.

Amplificació: Producció de múltiples còpies d'un mateix gen per replicació selectiva d'un fragment determinat.

Anticòs: proteïna del sistema immunitari encarregada d'unir-se de manera específica a substàncies foranies, actuant com a mecanisme de defensa davant elements estranys com bacteries, virus o paràsits.

Antigen: Substància que desencadena la formació d'anticossos i té capacitat per induir una resposta immunitària.

Apoptosis: forma de mort cel·lular regulada genèticament.

BcR: macromolècula d'immunoglobulina no secretable capaç de reconèixer un antigen únic i que es troba a la superfície de la membrana cel·lular de limfòcits B.

Cassette: amplia seqüència de DNA que codifica per un o més gens relacionats amb una funció bioquímica clau.

cDNA: fragment de DNA de cadena senzilla sintetitzat a partir d'un motlle d'RNA madur i que normalment s'utilitza per a la clonació de gens.

Cèl·lula autoreactiva: cèl·lula B que no ha madurat correctament i que el propi sistema immunitari reconeix com a aberrant.

Cèl·lula B naïve: tipus de cèl·lula B que encara no ha tingut contacte amb l'antigen, però que ja expressa immunoglobulines a la seva membrana cel·lular.

Cèl·lula natural killer (NK): són limfòcits del sistema immunitari encarregats de la destrucció de cèl·lules infectades o que poden ser cancerígenes.

Cèl·lula B memòria: tipus de cèl·lula B madura que recorda la interacció amb el mateix patogen i genera una resposta ràpida i de més intensitat davant d'una o subsegüents infeccions d'aquest.

Cèl·lula plasmàtica: també conegudes com a plasmòcits, encarregada de produir elevades quantitats d'anticossos de forma activa.

Cèl·lula pluripotent hematopoètica: cèl·lula amb capacitat de diferenciar-se a qualsevol tipus cel·lular hematopoètic.

Centroblast: cèl·lula B activada de grans dimensions present als fol·licles dels ganglis limfàtics.

Centròcit: cèl·lula B de mida petita present als fol·licles dels ganglis limfàtics.

CHOP: tractament de quimioteràpia que utilitza ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina i prednisona.

Cicle cel·lular: conjunt ordenat de successos que condueixen al creixement de la cèl·lula i a la divisió en cèl·lules filles.

Ciclins: família de proteïnes involucrades en la regulació del cicle cel·lular.

Clon: cèl·lula genèticament idèntica a una altra.

Centre germinal: regió dels fol·licles limfoides dels ganglis format per cèl·lules que s'activen i proliferen, així com cèl·lules fagocítiques. És la regió on tindrà lloc el contacte amb l'antigen.

Clúster: Conjunt de gens que codifiquen per la mateixa proteïna. També dit de l'agrupació de mostres que comparteixen característiques moleculars, biològiques, patològiques i/o clíniques.

Deleció: anomalia estructural cromosòmica que consisteix en la pèrdua d'un fragment de DNA d'un cromosoma.

Desnaturalització: canvi estructural de les proteïnes o els àcids nucleïcs, que consisteix en perdre la seva estructura nativa i el seu funcionament òptim, provocant també un canvi en les seves propietats físico-químiques.

Diferenciació cel·lular: procés pel qual les cèl·lules pateixen modificacions citològiques donant lloc a una forma i funció determinada durant el desenvolupament embrionari o a la vida d'un organisme pluricel·lular, especialitzant-se en un tipus cel·lular.

DNA: De l'anglès *deoxyribonucleic acid*, macromolècula que forma part de totes les cèl·lules i que conté tota la informació genètica utilitzada durant el desenvolupament i el funcionament dels organismes vius.

Dosi gènica: número de còpies d'un gen, és a dir, número de vegades que un gen estat repetit en el genoma.

Downstream: convenció utilitzada per descriure les característiques d'una seqüència de DNA, relacionat amb la transcripció per la RNA polimerasa o la traducció pel ribosoma. En aquest cas en posició 3', o també corrent avall.

Edició del receptor: mecanisme pel qual s'intenta recuperar a les cèl·lules autoreactives mitjançant una nova recombinació VJ de la cadena lleugera, que permet a la cèl·lula expressar una nova IG no reactiva per continuar amb el seu procés de maduració.

Efecte *Batch*: són les fonts de variació que s'han afegit a les mostres durant la seva manipulació.

Electroforesi: tècnica per a la separació de molècules segons la mobilitat d'aquestes en un camp electroforètic

***Enhancer*:** també conegut com potenciador o amplificador. Es una regió curta de DNA que pot unir-se a proteïnes per augmentar els nivells de transcripció de gens o grup de gens.

Esplenomegàlia: augment de volum patològic de la melsa també conegut com hipertrofia de la melsa.

Estereotip: reordenament prototipat, conjunt de seqüències amb característiques comunes.

Estimulació antigènica: senyals generades per el limfòcit B després d'haver reconegut a un antigen que el porten a proliferar i a diferenciar-se.

Exonucleasa: enzim hidrolasa que catalitza la ruptura d'enllaços fosfodièsters. Escindeixen l'últim nucleòtid de l'extrem 5' o 3' d'un polinucleòtid i poden degradar per complet un àcid nucleic lineal.

Expressió gènica: procés pel qual tots els organismes transformen la informació codificada als àcids nucleïcs en les proteïnes necessàries per seu desenvolupament i funcionament.

Factor de transcripció: proteïna que s'uneix a seqüències de DNA específiques i controla la transcripció de la informació genètica de DNA a RNA missatger.

Fluorocrom: component d'una molècula que fa que aquesta sigui fluorescent.

Fol·licle limfoide primari: tipus d'organització del teixit limfoide de forma esfèrica constituït principalment per cèl·lules B predominantment madures que no han estat estimulades recentment per antigens. Estan presents en tots els òrgans encapsulats del sistema immunitari (ganglis, melsa)

Fol·licle limfoide secundari: és l'estructura que es forma quan les cèl·lules del fol·licle limfoide primari es desenvolupen en resposta a l'estimulació antigènica i comencen a proliferar per donar lloc a cèl·lules que produeixen anticossos.

Gangli limfàtic: component del sistema limfàtic que actua com a filtre per a partícules estranyes.

Gen: seqüència ordenada de nucleòtids en el DNA, que conté la informació necessària per a la síntesis d'una macromolècula amb funció cel·lular específica, habitualment proteïnes però també RNAm, RNAr i RNAt.

Gen supressor de tumors: gen que redueix la probabilitat de que una cèl·lula d'un organisme multicel·lular es transformi en una cèl·lula cancerígena.

Genoma: és la totalitat de la informació genètica que posseeix un organisme particular i que codifica per ell mateix.

Genotip: dotació dels gens o al·lels que presenta una espècie o individu concret.

Granulòcit: cèl·lula amb grànuls que contenen enzims i altres substàncies encarregades de la destrucció de patògens.

Guany: addició d'un fragment de material genètic mitjançant el qual s'adquireix una còpia més d'un gen determinat per replicació del fragment de DNA que conté.

Haplotip: combinació d'al·lels de diferents locus d'un cromosoma que són transcrits junts.

Hibridació: procés d'unir dues cadenes complementàries de DNA o RNA.

Hipermutació somàtica: mecanisme cel·lular que s'encarrega de diversificar els receptors que utilitza el sistema immune per reconèixer a la gran varietat d'agents externs.

Hot-spot: punts o zones del genoma on es donen mutacions amb una major freqüència que l'esperada si es distribuïssin a l'atzar.

Immunofenotip: característiques immunoquímiques i immunològiques d'una cèl·lula o d'una població cel·lular.

Immunoglobulina: anticòs.

Immunohistoquímica: procediment histopatològic que es basa en la utilització d'un anticòs específic, prèviament marcat mitjançant un enllaç químic amb un enzim que pot transformar un substrat visible.

Índex proliferatiu: percentatge de cèl·lules que es troben en fase S del cicle cel·lular, que dona informació de la velocitat de reproducció de les cèl·lules i possiblement l'agressivitat del tumor.

Indolent: tipus de tumor caracteritzat per tenir baix índex proliferatiu i bon pronòstic, amb poca simptomatologia.

Inestabilitat genòmica: quan en una espècie amb un cariotip estable es produeixen variacions que modifiquen a l'atzar el número normal de cromosomes o bé s'observen alteracions estructurals que modifiquen el comportament cromosòmic cel·lular.

Isotip: tipus o classe d'anticòs determinada per la part constant d'aquest.

Ki67: antigen que identifica les cèl·lules proliferants dins d'un tumor, la positivitat d'aquest correlaciona amb el grau de diferenciació.

Leucèmia: grup de malalties malignes de la medul·la òssia que provoca un augment incontrolat de leucòcits.

Limfadenopatia: trastorn inespecífic dels ganglis limfàtics, en la majoria dels casos es fa servir quan hi ha tumefacció, augment de volum o inflamació.

Limfòcits: són les úniques cèl·lules de l'organisme capaces de reconèixer i distingir específicament diferents determinants antigènics i generar una resposta immunitària, especificitat i memòria.

Limfòcit B: tipus de limfòcits que s'encarreguen de la producció d'anticossos i que juguen un paper important en la resposta cel·lular humoral.

Limfòcit T: tipus de limfòcits mediadors de immunitat cel·lular. Els seus precursors procedeixen de la medul·la òssia però migren i maduren al timus.

Limfòcits T *Helper*: limfòcits T CD4⁺, també coneguts com col·laboradors o efectors, que estableixen i maximitzen les capacitats de defensa del sistema immunitari.

Limfoma: conjunt de malalties neoplàsiques que es desenvolupen al sistema limfàtic, també es coneixen com a tumors sòlids hematològics.

Locus/Loci: posició d'un gen en un cromosoma.

Macròfags: cèl·lula amb capacitat immunològica capaç de migrar mitjançant un moviment ameboide en resposta a estímuls determinats.

Medul·la òssia: tipus de teixit que es troba a l'interior de grans ossos, on es produeix la hematopoesis gràcies a les cèl·lules mare hematopoètiques que conté.

Microambient: és l'entorn cel·lular d'una cèl·lula tumoral que influeix en el seu comportament i desenvolupament.

Microarray: superfície sòlida sobre la qual s'hi fixen fragments de DNA, per tal de fer anàlisi d'expressió diferencial.

MicroRNA: RNA monocatenari que té la capacitat de regular l'expressió d'altres gens mitjançant diversos processos.

Missmatch: Desaparellament entre parells de bases puntuals del DNA provocat per errors de la DNA polimerasa.

Mutació: canvi permanent en el DNA que es transmet a la descendència i que pot ser causat per agents endògens o exògens.

Neoplàsia: alteració de la proliferació i, moltes vegades, de la diferenciació cel·lular que es manifesta per la formació d'una massa de cèl·lules tumorals.

Neutròfil: glòbuls blancs del tipus granulòcit amb capacitat per travessar els vasos sanguinis per migrar cap als teixits ajudant a la destrucció de bacteries i fongs responent a estímuls inflamatoris.

Oncogen: gen anormal activat que procedeix de la mutació o activació d'un gen normal conegut com proto-oncogen. Són els responsables de la transformació d'una cèl·lula normal en una cèl·lula maligne que desenvoluparà un determinat càncer.

Oncomir: microRNA la sobreexpressió o infraexpressió del qual està relacionada amb càncer.

Progressió: les cèl·lules tumorals pateixen canvis en el seu fenotip pels quals adquireixen característiques com pèrdua de l'adhesivitat, capacitat de migració, angiogènesi, etc, agreujant la malaltia.

Pseudogen: seqüència de nucleòtids similar a la del gen normal però que no dona com a resultat un producte funcional, és a dir, que no s'expressa.

Primer: seqüències de DNA curtes i complementàries a una regió concreta del DNA utilitzats per a la replicació d'aquest.

Proto-oncogen: gens que regulen el creixement i la diferenciació cel·lular.

Reordenament: combinació dels segments dels gens de les IG per tal de donar una proteïna funcional.

Rituximab: anticòs monoclonal quimèric, obtingut per enginyeria genètica, que s'uneix a l'antigen CD20 expressat en limfòcits pre-B i B madurs, induint apoptosi i mort cel·lular. S'utilitza pel tractament de neoplàsies hematològiques.

RNA: (de l'anglès *Ribonucleic Acid*) és un àcid ribonucleic format per una cadena senzilla de ribonucleòtids. S'encarrega de diferents funcions però principalment dirigeix les etapes intermèdies de la síntesi proteica.

Sang perifèrica: sang que circula per a tot l'organisme i que no es troba retinguda en cap compartiment.

Signatura gènica: conjunt de gens l'expressió dels quals ens permet identificar un subgrup de pacients amb una determinada malaltia.

Sonda: fragment específic de DNA utilitzat com a marcador i complementari a la seqüència de DNA que es vol estudiar.

Timus: òrgan del sistema limfàtic responsable de la maduració dels limfòcits T.

Tecnologia nanofluídica: és el camp dedicat al control i manipulació de la matèria a una escala menor que un micròmetre, és a dir, a nivell d'àtoms i molècules.

Tetraploïdia: existència de dos cromosomes extrems en un organisme diploide formant un quartet de cromosomes homòlegs.

Transcripció: primer procés de l'expressió gènica mitjançant el qual es transfereix la informació continguda a la seqüència del DNA cap a la seqüència de la proteïna utilitzant diversos RNAs com a intermediaris.

Transcripció reversa o inversa: procés molecular que implica la generació d'una doble cadena de DNA a partir d'un RNA de cadena simple.

Trisomia: existència d'un cromosoma extra en un organisme diploide formant un triplet de cromosomes homòlegs.

Tumor: qualsevol alteració dels teixits que produeixi un augment del volum degut a la proliferació massiva de cèl·lules.

Upstream: corrent amunt o 5'.

ZAP-70: proteïna normalment expressada a la superfície de membrana de les cèl·lules T i cèl·lules NK que és utilitzada com a marcador de pronòstic en el diagnòstic de la LLC.

Zona del mantell: és la zona més perifèrica dels fol·licles limfoides secundaris dels ganglis limfàtics, constituïda per cèl·lules B de morfologia i fenotip similar als limfòcits B del fol·licle primari.