



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Diferenciación plasmocelular en linfomas no-Hodgkin de células B: implicaciones clínicas y terapéuticas

Carla Solé Cañadas

**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](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) 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 ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (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](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) 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 o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (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](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) 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 nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those 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.

A microscopic image showing a dense population of cells, likely lymphocytes, with varying sizes and shapes, some with prominent nuclei and others appearing more rounded or irregular. The cells are stained, showing dark nuclei and lighter cytoplasm/extracellular matrix.

# **DIFERENCIACIÓN PLASMOCELULAR EN LINFOMAS NO-HODGKIN DE CÉLULAS B: IMPLICACIONES CLÍNICAS Y TERAPÉUTICAS**

---

Carla Solé Cañadas

2017







FUNDACIÓ CLÍNIC PER LA RECERCA BIOMÈDICA  
DEPARTAMENT D'ANATOMIA PATOLÒGICA, FARMACOLOGIA I  
MICROBIOLOGIA  
FACULTAT DE MEDICINA, UNIVERSITAT DE BARCELONA  
HOSPITAL CLÍNIC DE BARCELONA

**DIFERENCIACIÓN PLASMOCELULAR EN LINFOMAS  
NO-HODGKIN DE CÉLULAS B:  
IMPLICACIONES CLÍNICAS Y TERAPÉUTICAS**



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

Tesis presentada por **Carla Solé Cañadas**  
para optar al grado de Doctor  
en el programa de doctorado de Medicina

Directores de tesis:

Dr. Antonio Martínez Pozo

Dr. Gaël Roué

Barcelona, 2017



**A mis abuelas,**

**a mis padres**

**y a Gaizka**





## AGRADECIMIENTOS

Con estas páginas cierro un episodio de mi carrera investigadora, aunque espero que no el último. A lo largo de estos 5 años de tesis doctoral me he encontrado con gente a la que me gustaría agradecer que haya estado a mi lado, tanto en los momentos buenos como en los malos que en toda tesis se pasan.

**E**mprendí este camino gracias a la oportunidad que me dio mi director de tesis **Antonio Martínez Pozo**, que me ha enseñado mucho acerca de la ciencia y de mis capacidades como científica, por ello, quiero agradecerle que me brindara la oportunidad de realizar esta tesis doctoral que tanto me ha enseñado. Otra parte esencial de esta experiencia y sin la cual seguramente no se habría escrito esta tesis doctoral, es mi codirector de tesis **Gaël Roué**. A él le quiero agradecer el apoyo y la perseverancia, no rendirse y ayudarme a llegar hasta el final de esta etapa.

A lo largo de mi trayectoria en el laboratorio del Centro de Investigación Esther Koplowitz, me he encontrado con muchos compañeros y profesionales. En primer lugar agradecer a **Elías Campo** y a su grupo de investigadores: **Lluís Hernández**, **Silvia Beà**, **Itziar Salaverria**, **Iñaki Martín-Subero** y **Virginia Amador**, y a **Dolors Colomer** y a su grupo de investigadores **Patricia Pérez Galán** y el ya agradecido Gaël Roué, haberme acogido y hecho un hueco en sus grupos.

En especial, quiero dar las gracias a dos de mis pilares esenciales durante esta tesis, que estuvieron conmigo desde el principio: **Jara** y **Robert**, porque han sido unos magníficos compañeros, tanto en los malos como en los buenos momentos. Sin ellos esta experiencia no habría sido la misma y me alegro de tenerlos en mi vida porque sé que siempre podré contar

con ellos. Por otro lado, quiero agradecer su apoyo al equipo SOX: **Marta**, mi compañera de locuras, porque cuando estamos juntas nos retroalimentamos; **Patri**, por ser la post más molona; y **Álvaro** que se maneja entre pipetas y el *skate*. También al equipo Epi: **Marta**, que siempre está dispuesta a subir el ánimo a cualquiera; **Ana**, que siempre se apunta a cualquier plan; **Roser**, por ponerle música y canciones a todos mis días; **Núria**, la técnico todoterreno que se atreve con todo y “**Little**” **Núria**, la campestre del grupo. Y no menos importantes, los *frikis* de los ordenadores: **David**, por hacerme participe de sus aventuras; **Martí**, el mallorquí que odia el pan de Barcelona; y **Ferran** con el que comparto gustos musicales.

Del “otro lado” del laboratorio me gustaría agradecerles a todos su compañerismo, pero en especial: a **Vani**, mi proveedora de dulce de leche, siempre dispuesta a echarme una mano; a **Clara**, que le tocó ser mis manos durante unos meses y a quién le agradezco mucho su trabajo; también a **Alba** siempre sonriente, y por último a **Sandra**, que me ayudó sobretodo en mis inicios, suministrándome protocolos y programas informáticos.

Me gustaría agradecer su colaboración al equipo de Anatomía Patológica / Hematología, con el que he trabajado conjuntamente en los artículos que forman esta tesis doctoral: **Dani Martínez, Blanca González y Eva Giné**.

**L**a parte experimental concluyó hace ya dos años, desde entonces trabajo en Biodonostia (San Sebastián), de manera que me gustaría agradecer a **Charles Lawrie** haberme dado la oportunidad de seguir mi formación investigadora en su laboratorio, en el cual he aprendido muchísimas técnicas nuevas y he conocido gente fantástica, a la que también me gustaría incluir en estas líneas, ya que han estado presentes en la escritura de esta tesis. En primer lugar a mi grupo de Oncología Molecular: **Lorea**, por ser siempre una fuente de información y de ayuda; **María Arestin** por enseñarme nuevas

técnicas; **Ibai**, el gurú de la informática y la estadística del laboratorio; **Erika** y **Giovanni**, mis compis de linfoma; **Esther**, por preocuparse por mi salud mental y mis agobios; **María Armesto**, por estar siempre dispuesta a echar una mano; y por último al grupo de mama: **María Caffarel** y **Angela**, siempre tan sonrientes. En segundo lugar a los compañeros de laboratorio, el grupo de Bioingeniería: **Haizea**, con la que he compartido los nervios de la última fase de nuestras tesis; **Laura**, porque con sus yndriagadas me ha dado muchos momentos de diversión; **Araika**, compañera de cafés con la que también me he echado muchas risas; y cómo no, a mi gemela rubia **Vir**, a quien le quiero agradecer todos los ánimos que me ha dado y haber sufrido casi tanto como yo los últimos meses. Y por último, al grupo de Oncología Celular, en especial a los *Tweens*: **Mikel**, por ser mi *bihotzi* y sacarme siempre una sonrisa; mis vecinas de pasillo, con las que formo el Triángulo de las Bermudas, **Miren** y **Leire**; **Jaione**, por sus diminutivos y sus onomatopeyas, que le dan gracia a nuestras conversaciones; **Ander** (Thor), mi corderito siempre alegre; y **Juncal**, que parece muy dura pero que por dentro sé que no lo es tanto.

**A**demás de a todos mis compañeros y amigos del ámbito laboral también me gustaría agradecer su paciencia y su amistad a **Sergio** y **Anna**, mis nenitos. Nos unió un viaje que cambió nuestras vidas y durante más de 10 años hemos compartido muchos momentos juntos. Incluso ahora, pese a la distancia, sé que siempre puedo contar con ellos, ¡gracias por todo!

Me gustaría agradecer su amistad a **Silvia**, con la que empecé la carrera de biología. A pesar de los años seguimos muy unidas, siempre preocupada por la evolución de mi tesis y un gran apoyo en mi vida.

Quiero agradecer en especial a mis ROOMSC4PERS: **Laura** y **Josu**, darme muchísimos fines de semana de diversión (¡y más que vendrán equipo!); y a Josu, además, la parte artística de esta tesis, ya que fue él quien diseñó la portada, aligerándome el trabajo de terminarla.

**Y** llegados a este punto, agradecerle mucho el estar a mi lado y apoyarme en todas mis decisiones, a mi compañero de vida **Gaizka**, que inició y finaliza conmigo este camino. Espero que pasemos muchísimos años juntos porque contigo todo es mejor, te quiero.

Y por último, a mi **familia**, parte esencial de mi vida, a la que siempre he estado muy unida, y en especial a mis **padres**, para quienes no tengo palabras suficientes con las que agradecer todo lo que les debería agradecer, porque sé que a lo largo de mi vida me han ayudado en todo lo que han podido y más; en esta tesis también han sufrido conmigo, así que solo me queda decirles que les quiero mucho y que si he logrado llegar hasta aquí es principalmente gracias a ellos.

Es posible que a lo largo de estos agradecimientos me haya dejado de nombrar a gente que ha estado conmigo (no solo estos 5 años) y que han sido importantes en mi vida y en mi tesis de una u otra manera. A esas personas también, por supuesto, les agradezco todo lo que me han aportado.

**“What we need is more  
people who specialize in  
the impossible”**

*Theodore Roethke*

**“L’essentiel  
est invisible pour  
les yeux”**

*Le Petit Prince*



## RESUMEN TESIS

La diferenciación plasmocelular es un fenómeno relativamente frecuente en algunos linfomas no-Hodgkin, estos linfomas presentan un bloqueo incompleto de la diferenciación plasmocelular. La diferenciación plasmocelular se ha observado ocasionalmente en MCL y CLL<sup>1-7</sup>.

En el caso del MCL se ha visto que el subtipo indolente, que se caracteriza por ser SOX11-, presenta ciertos niveles de diferenciación plasmocelular<sup>8-10</sup>. Se ha descrito que el silenciamiento de SOX11 produce una reducción de los niveles de PAX-5, permitiendo así una diferenciación plasmocelular temprana<sup>11</sup>. En el MCL es muy importante la detección de SOX11, sobre todo en los casos ciclina D1 negativos, ya que este factor de transcripción puede segregar los pacientes según el pronóstico<sup>12-15</sup>. No obstante, debido a la elevada homología que existe entre SOX11 y SOX4, la discriminación entre ambas proteínas dificulta la tarea en el diagnóstico de rutina<sup>16,17</sup>. En esta tesis doctoral, hemos determinado que los anticuerpos más relevantes para la detección de SOX11 son el anti-SOX11<sup>143</sup> y el anti-SOX11<sup>MRQ-58</sup>. Por western blot, el anti-SOX11<sup>MQR-58</sup> parece ser el anticuerpo más sensible y más específico. Por el contrario, en IHQ el anti-SOX11<sup>MQR-58</sup> detecta la proteína con menos sensibilidad, siendo SOX11<sup>143</sup> la mejor opción para IHQ. Además, hemos podido observar que dos poblaciones celulares, las células foliculares dendríticas y las células de las vénulas del endotelio alto, también son SOX11+, aunque serán necesarios más estudios para determinar si podría ser un marcador para estas células y para los tumores derivados de ellas.

En la CLL se ha visto que la diferenciación plasmocelular estaba vinculada a la expresión de BLIMP-1<sup>5,6</sup>, el principal regulador de la diferenciación a célula plasmática. No obstante, los pacientes con CLL no presentan una diferenciación total a célula plasmática<sup>18</sup>. En esta tesis hemos estudiado un conjunto de 137 pacientes, en los cuales hemos visto que la expresión de



BLIMP-1 es mucho más frecuente de lo previamente descrito <sup>6</sup>. Hemos encontrado mediante western blot, que la expresión mayoritaria en los pacientes de CLL, tanto en tejido como en sangre periférica, era la isoforma alternativa BLIMP-1Δ6, independientemente del factor de splicing SF3B1. Hemos visto que esta isoforma estaba presente tanto en el núcleo como en el citoplasma, pero mayoritariamente en este último, lo que podría facilitar su interacción con las otras isoformas de BLIMP-1. Mediante la estimulación de las células, derivadas de pacientes de CLL, hemos visto que se producía una diferenciación parcial de las células, aumentando BLIMP-1α, IRF-4 y CD38. En cambio, se mantenían algunos de los factores que definen la identidad de célula B, como PAX-5 o CD19. Además no variaba la expresión de la isoforma alternativa BLIMP-1Δ6. Por lo tanto, la expresión de la isoforma BLIMP-1Δ6 podría ser el responsable del bloqueo de la diferenciación plasmocelular en la CLL. Serían necesarios más estudios para esclarecer el mecanismo por el cual la CLL expresa esta isoforma.

## LISTA DE ARTÍCULOS

Esta tesis ha sido generada a partir de los siguientes trabajos, a los que se hace referencia en el texto con los números romanos I y II:

I: Soldini D, Valera A, **Solé C**, Palomero J, Amador V, Martin-Subero JI, Ribera-Cortada I, Royo C, Salaverria I, Beà S, Gonzalvo E, Johannesson H, Herrera M, Colomo L, Martinez A, Campo E. **Assessment of SOX11 expression in routine lymphoma tissue sections: characterization of new monoclonal antibodies for diagnosis of mantle cell lymphoma.**

*Am J Surg Pathol.* 2014 Jan; 38(1): 86-93. PMID: 24145648

II: **Solé C**, Martínez D, Giné E, Gonzalez-Farre B, Pérez-Galán P, Roncador G, Campo E, Matutes E, López-Guillermo A, Roué G\*, Martinez-Pozo A\*. **Expression of a truncated B lymphocyte-induced maturation protein-1 isoform is associated with an incomplete plasmacytic differentiation program in chronic lymphocytic leukaemia.** *Leuk Lymphoma.*

2017 Jun; 2: 1-4. PMID: 28573896

\* GR y AM comparten la autoría principal de este manuscrito

Las reimpresiones se hicieron con el permiso de los respectivos editores.

Otros trabajos publicados por el autor asociados con esta tesis:

1. Martinez D, Valera A, Perez NS, Sua Villegas LF, Gonzalez-Farre B, **Sole C**, Gine E, Lopez-Guillermo A, Roue G, Martinez S, Sant F, Warzocha K, Robak T, Czader M, Villamor N, Colomo L, Campo E, Martinez A. **Plasmablastic transformation of low-grade B-cell lymphomas: report on 6 cases.** *Am J Surg Pathol.* 2013 Feb;37(2):272-81. PMID: 23282972
2. Gonzalez-Farre B, Rovira J, Martinez D, Valera A, Garcia-Herrera A, Marcos MA, **Sole C**, Roue G, Colomer D, Gonzalvo E, Ribera-Cortada I, Araya M, Lloreta J, Colomo L, Campo E, Lopez-Guillermo A, Martinez A. **In vivo intratumoral Epstein-Barr virus replication is associated with XBP1 activation and early-onset post-transplant lymphoproliferative disorders with prognostic implications.** *Mod Pathol.* 2014 Dec;27(12):1599-611. PMID: 24762547

## TABLA DE CONTENIDOS

LISTADO DE ABREVIACIONES .....	7
INTRODUCCIÓN .....	13
1. BIOLOGÍA DE LOS LINFOCITOS B .....	15
1.1. Desarrollo independiente de antígeno .....	16
1.1.1. Selección positiva y negativa de los linfocitos.....	19
1.2. Desarrollo dependiente de antígeno: Centro germinal .....	20
1.2.1. Formación del centro germinal.....	20
1.2.2. Reacción del centro germinal.....	22
1.3. Regulación del desarrollo post-GC de los linfocitos B .....	25
1.3.1. Célula plasmática .....	26
1.3.2. Linfocitos B de memoria.....	28
1.3.3. BLIMP-1 .....	28
2. LINFOMAGÉNESIS Y LINFOMAS NO-HODGKIN (NHLs) .....	33
2.1. Linfoma de células del manto (MCL) .....	35
2.1.1. SOX11 .....	39
2.1.2. Tratamiento del MCL.....	40
2.2. Leucemia linfática crónica (CLL) .....	42
2.2.1. Tratamiento de la CLL .....	47
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	49
RESULTADOS .....	53

ARTÍCULO I.....	55
ARTÍCULO II .....	67
DISCUSIÓN.....	77
CONCLUSIONES .....	89
ANEXO I.....	93
REFERENCIAS .....	103

## LISTADO DE ABREVIACIONES

ABC-DLBCL	Linfoma difuso de células grandes tipo activado ( <i>Activated B Cell-like – Diffuse Large B-Cell Lymphoma</i> )
AID	Desaminasa de citidina inducida por activación ( <i>Activation-Induced cytidine Deaminase</i> )
AKT	Serina-treonina quinasa tipo 1 ( <i>serine/threonine kinase 1</i> )
ARF	Factor de ribosilación – ADP ( <i>ADP-Ribosylation Factor</i> )
ATM	Ataxia telangiectasia mutado ( <i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i> )
BCL-1	Ciclina D1 ( <i>cyclin D1</i> ) (= CCND1)
BCL-2	Proteína 2 de la leucemia/linfoma de células B ( <i>B Cell Leukemia / Lymphoma 2</i> )
BCL-6	Proteína 6 de la CLL / linfoma de células B ( <i>B-Cell CLL / Lymphoma protein 6</i> )
BCR	Receptor de antígenos de la célula B ( <i>B-Cell Receptor</i> )
BIRC3	<i>Baculoviral IAP Repeat Containing 3</i>
BL	Linfoma de Burkitt ( <i>Burkitt Lymphoma</i> )
BLIMP-1	Factor de transcripción inducido por linfocitos B ( <i>B-lymphocyte-induced transcription factor</i> )
BTK	Tirosina quinasa de Bruton ( <i>Bruton Tyrosine Kinase</i> )
CCND1	Ciclina D1 ( <i>cyclin D1</i> )
CCND2	Ciclina D2 ( <i>cyclin D2</i> )
CCND3	Ciclina D3 ( <i>cyclin D3</i> )
CD20	Cúmulo de diferenciación 6 ( <i>Cluster of Differentiation 20</i> )
CD38	Cúmulo de diferenciación 38 ( <i>Cluster of Differentiation 38</i> )
CD40	Cúmulo de diferenciación 40 ( <i>Cluster of Differentiation 40</i> )
CD40L	Ligando para el cúmulo de diferenciación 40 ( <i>Cluster of Differentiation 40 Ligant</i> )
CD136	Cúmulo de diferenciación 136 ( <i>Cluster of Differentiation 136</i> )
CDK4/6	Quinasa 5 y 6 dependiente de ciclina ( <i>Cyclin-Dependent Kinase 4/6</i> )
CDKN2A	Inhibidor 2A de la quinasa dependiente de ciclina ( <i>Cyclin Dependent Kinase inhibitor 2A</i> )
CHK2	Quinasa 2 del punto de control ( <i>Check Point Kinase 2</i> )

CIITA	Transactivador del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II ( <i>Class II Major Histocompatibility Complex Transactivator</i> )
CLL	Leucemia linfática crónica ( <i>Chronic Lymphocytic Leukaemia</i> )
CLPs	Progenitores linfocíticos comunes de la médula ósea ( <i>Common Lymphoid Progenitors</i> )
CMP	Progenitor mielocítico común ( <i>Common Myeloid Progenitor</i> )
CNAs	Alteración del número de copias ( <i>Copy Number Alterations</i> )
CR	Remisión completa ( <i>Complete Remission</i> )
CREBBP	Proteína de unión a CREB ( <i>CREB Binding Protein</i> )
CSR	Cambio de isotipo ( <i>Class Switch Recombination</i> )
CXCR4	C -X- C receptor de quimiocinas tipo 4 ( <i>C-X-C chemokine Receptor type 4</i> )
DCs	Células dendríticas ( <i>Dendritic Cell</i> )
DLBCL	Linfoma difuso de células grandes ( <i>Diffuse Large B-Cell Lymphoma</i> )
DNA	Ácido desoxirribonucleico ( <i>DesoxyriboNucleic Acid</i> )
dNTPs	Desoxirribonucleótidos ( <i>desoxynucleotide</i> )
DTT	Ditiotreitol
ELP	Progenitor linfocítico temprano ( <i>Early Lymphoid Progenitor</i> )
ETP	Precusores del linaje de células T del timo ( <i>Early Thymic Progenitors</i> )
EUA	Estados Unidos de América
FBS	Suero fetal de vaca ( <i>Fetal Bovine Serum</i> )
FDA	Administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos ( <i>Food and Drug Administration</i> )
FDC	Célula dendrítica folicular ( <i>Follicular Dendritic Cell</i> )
FL	Linfoma folicular ( <i>Follicular Lymphoma</i> )
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa ( <i>GlycerAldehyde 3-Phosphate DeHydrogenase</i> )
GCB-DLCBL	Linfoma difuso de células grandes tipo centro germinal ( <i>Germinal Center B cell-like – Diffuse Large B-Cell Lymphoma</i> )
GEP	Perfil de expresión génica ( <i>Gene Expression Profiling</i> )

H3	Histona H3
H3K9	Lisina 9 de la histona 3 ( <i>Histone H3 Lysine 9</i> )
H4	Histona H4
HCL	Leucemia de células peludas ( <i>Hairy Cell Leukaemia</i> )
HDAC	Histona deacetilasa ( <i>Histone DeAcetilase</i> )
HL	Linfoma de Hodgkin ( <i>Hodgkin Lymphoma</i> )
HMG	Grupo de alta movilidad ( <i>High Mobility Group</i> )
HRP	Peroxidasa del rábano picante ( <i>HorseRadish Peroxidase</i> )
Ig	Inmunoglobulinas
IgH	Cadena pesada de las inmunoglobulinas ( <i>Immunoglobulin Heavy chain</i> )
IGHV	Región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas ( <i>ImmunoGlobulin Heavy Variable</i> )
ILC	Células linfoides innatas ( <i>Innate Lymphoid Cells</i> )
IRF-4	Factor regulador del interferón 4 ( <i>Interferon-Regulatory Factor 4</i> )
ISMCN	Neoplasia de células del manto <i>in situ</i> ( <i>In Situ Mantle Cell Neoplasm</i> )
JAK2	Quinasa Janus 2 ( <i>Janus Kinase 2</i> )
LSD1	Demetilasa-1 específica de lisinas ( <i>Lysine-Specific histone Demethylase 1</i> )
MALT	Tejido linfático asociado a la mucosa (o linfoma asociado a este) ( <i>Mucosa Associated Lymphoid Tissue</i> )
MCL	Linfoma de células del manto ( <i>Mantle Cell Lymphoma</i> )
M-CLL	Leucemia linfática crónica con mutación en las regiones variables ( <i>Mutated-Chronic Lymphocytic Leukaemia</i> )
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad ( <i>Major Histocompatibility Complex</i> )
MicroRNA	MicroARN
MITF	Factor de transcripción asociado con microftalmia ( <i>Microphthalmia-associated Transcription Factor</i> )
MM	Mieloma múltiple ( <i>Multiple Myeloma</i> )
M-MLVRT	Transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina Moloney ( <i>Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcription</i> )



MPP	Progenitor multipotente ( <i>MultiPotent Progenitors</i> )
mRNA	ARN mensajero ( <i>messenger RNA</i> )
mTOR	Diana mecanicista de la rapamicina ( <i>mechanistic Target Of Rapamycin</i> )
NF-κB	Factor nuclear kappaB ( <i>Nuclear Factor kappa B</i> )
NGS	Secuenciación de nueva generación ( <i>Next Generation Sequencing</i> )
NHLs	Linfomas no-Hodgkin ( <i>Non-Hodgkin Lymphomas</i> )
NKs	Linfocitos citolíticos naturales ( <i>Natural Killer</i> )
ORR	Tasa de respuesta global ( <i>Overall Response Rate</i> )
OS	Supervivencia global ( <i>Overall Survival</i> )
PAX-5	Proteína de caja apareada 5 ( <i>Paired box protein 5</i> )
PCR	Reacción en la cadena de la polimerasa ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
Pd(N <sub>6</sub> )	Cebadores aleatorios (hexámero)
PEST	Prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S) y treonina (T)
PFS	Supervivencia libre de progresión ( <i>Progression Free Survival</i> )
PHSCs	Células madre hematopoyéticas pluripotentes ( <i>Pluripotent Hematopoietic Stem Cells</i> )
PMLB	Linfoma B primario mediastínico ( <i>Primary Mediastinal Large B-cell lymphoma</i> )
PRDI-BF1	Factor de unión al dominio I regulador positivo del gen de interferón beta ( <i>beta-interferon gene positive-regulatory domain I binding factor</i> )
PRDM	Proteína con dedos de zinc y dominio PR ( <i>PR domain zing finger protein</i> )
RAG1/RAG2	Gen activador de la recombinación 1 / 2 ( <i>Recombination Activating gene 1/2</i> )
RB1	Retinoblastoma 1
R-CHOP	Rituximab, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona
RNA	Ácido ribonucleico ( <i>RiboNucleic Acid</i> )
RT-PCR	Reacción en la cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa ( <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> )
RTU	Listo para usar (Ready To Use)

SCS	Seno subcapsular
SF3B1	Subunidad 1 del factor de empalme (splicing) 3B ( <i>Splicing Factor 3B subunit 1</i> )
SHM	Hipermutación somática ( <i>Somatic Hypermutation</i> )
SLL	Linfoma linfocítico de células pequeñas ( <i>Small Lymphocytic Lymphoma</i> )
SOX11	Caja SRY 11 ( <i>SRY-box 11</i> )
SOX12/22	Caja SRY 12/22 ( <i>SRY-box 12/22</i> )
SOX4	Caja SRY 4 ( <i>SRY-box 4</i> )
STAT-3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3 ( <i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i> )
STAT-5	Transductor de señal y activador de la transcripción 5 ( <i>Signal Transducer and Activator of Transcription 5</i> )
TAD	Dominio de transactivación ( <i>Trans-Activating Domain</i> )
TCR	Receptor de antígenos de la célula T ( <i>T Cell Receptor</i> )
TdT	Desoxirribonucleotidil transferasa ( <i>Terminal desoxynucleotidyl Transferase</i> )
T <sub>FH</sub>	Linfocito T cooperador ( <i>Follicular Helper T cell</i> )
TP53	Proteína tumoral p53 ( <i>Tumour Protein p53</i> )
U-CLL	Leucemia linfática crónica sin mutación en las regiones variables ( <i>Unmutated Chronic Lymphocytic Leukaemia</i> )
V	Región variable inmunoglobulinas
VLA-4	Antígeno de activación tardía-4 ( <i>Very Late Antigen-4</i> )
WHO	Organización mundial de la salud ( <i>World Health Organization</i> )
XBP-1	Proteína 1 de unión a la caja X ( <i>X-box Binding Protein 1</i> )
ZAP-70	Proteína quinasa 70 asociada a la cadena Z del receptor de las células T ( <i>Zeta chain of T-cell receptor Associated Protein kinase 70</i> )



## **INTRODUCCIÓN**





## 1. BIOLOGÍA DE LOS LINFOCITOS B

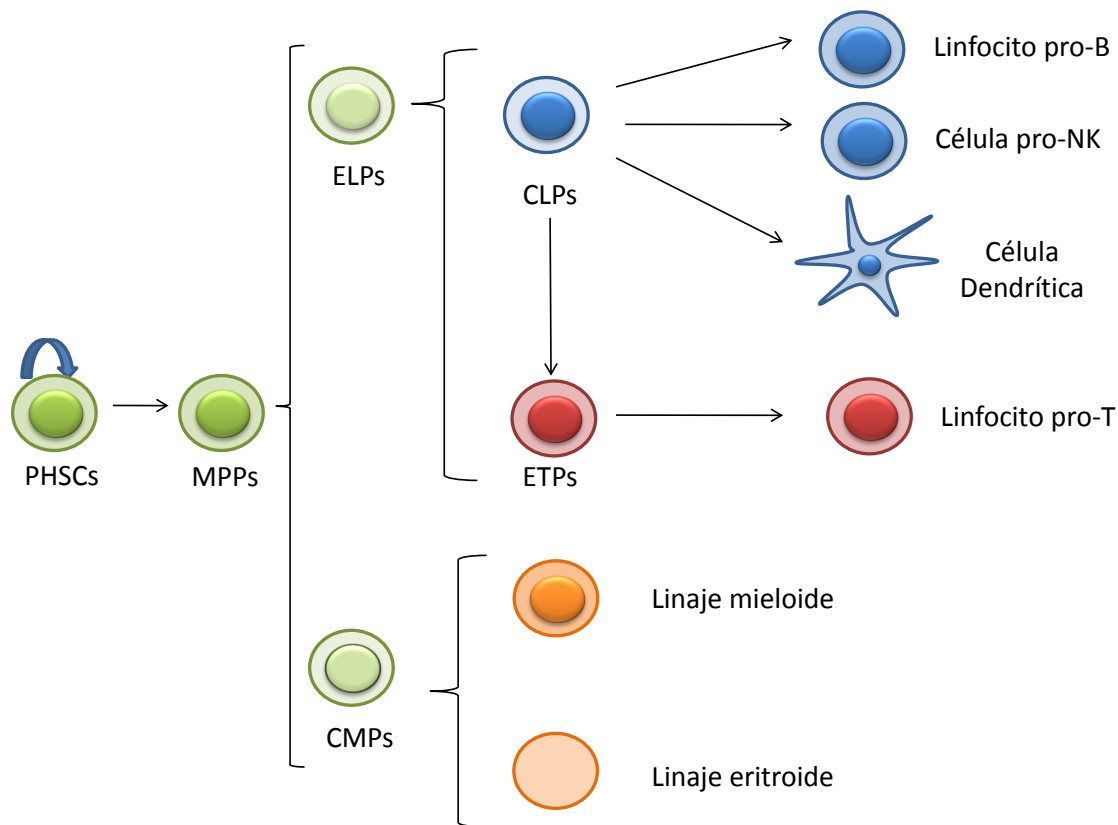
Los **linfocitos B** son unas células que forman parte de la inmunidad adaptativa del sistema inmunitario. Los linfocitos B son los encargados de producir los anticuerpos o inmunoglobulinas, en respuesta a la exposición a los antígenos <sup>19-21</sup>. Los anticuerpos se pueden presentar de dos formas distintas en los linfocitos B: unidos a la membrana, donde actúan como receptores para los antígenos, o bien, pueden ser secretados por las células plasmáticas, estos residen en la circulación, los tejidos y las mucosas, y neutralizan e impiden la entrada de los patógenos <sup>22</sup>. Al inicio del desarrollo fetal, la generación de las células de la sangre, conocida como **hematopoyesis**, tiene lugar en unos islotes sanguíneos del saco vitelino <sup>23</sup> y en el mesénquima paraaórtico <sup>24,25</sup>. Más tarde sucede en el hígado y en el bazo, y gradualmente va asumiendo esta función la médula ósea <sup>26</sup>.

El **sistema linfático** es una parte esencial del sistema inmunitario y está compuesto por los órganos linfáticos **centrales** o primarios y los órganos **periféricos** o secundarios. El timo y la médula ósea son los órganos linfáticos centrales, implicados en la producción y la selección de los linfocitos. Aunque tanto los linfocitos T como los B provienen de la médula ósea, su diferenciación se produce en localizaciones diferentes. En el caso de los linfocitos B su diferenciación continúa en la médula ósea, mientras que los linfocitos T se diferencian en el timo. Cuando se ha producido la diferenciación, los linfocitos maduros migran a través de la sangre a los órganos linfáticos periféricos. Los órganos linfáticos periféricos incluyen los nódulos linfáticos y los folículos linfáticos en las amígdalas, las placas de Peyer, el bazo y las adenoides, entre otros, los cuales están asociados al tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT). Los linfocitos se mantienen en estos órganos como linfocitos maduros vírgenes, hasta que se desencadena una respuesta inmunitaria y los linfocitos entran en contacto con el antígeno <sup>27</sup>. Así el desarrollo de los linfocitos B consta de una primera fase **independiente de**

**antígeno**, donde a partir de las células madre hematopoyéticas se desarrolla el linfocito B virgen que abandona la médula ósea y migra a los órganos linfáticos periféricos, donde se produce la segunda fase de desarrollo, **dependiente de antígeno**. En esta segunda fase los linfocitos B vírgenes entran en contacto con los antígenos, formando el centro germinal y produciendo finalmente las células de memoria o las células plasmáticas.

### 1.1. Desarrollo independiente de antígeno

El sistema hematopoyético genera constantemente un gran número de células especializadas a partir de **células madre hematopoyéticas pluripotentes (PHSCs)**, que tienen capacidad de auto-renovación y dan lugar a diferentes progenitores con una capacidad de diferenciación más restringida <sup>28-30</sup>. Uno de los primeros precursores diferenciados es el **progenitor multipotente (MPP)** <sup>31</sup>, que se encuentra en la bifurcación entre los linajes linfoide y mieloide. El MPP se puede diferenciar a **progenitor mielocítico común (CMP)** <sup>32</sup> o en **progenitor linfocítico temprano (ELP)** <sup>33</sup>. En este momento se expresan los genes activadores de recombinación (RAG-1, RAG-2 y TdT) y empieza la reorganización del locus de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IgH) <sup>34,35</sup>. Los ELPs pueden diferenciarse a **precursores del linaje de células T del timo (ETPs)** <sup>36</sup> o a **progenitores linfocíticos comunes de la médula ósea (CLPs)** <sup>37</sup>. Y por último, los progenitores linfocíticos comunes pueden generar **linfocitos B, linfocitos T, células dendríticas (DCs)** y **linfocitos citolíticos naturales (NKs)** (Figura 1).

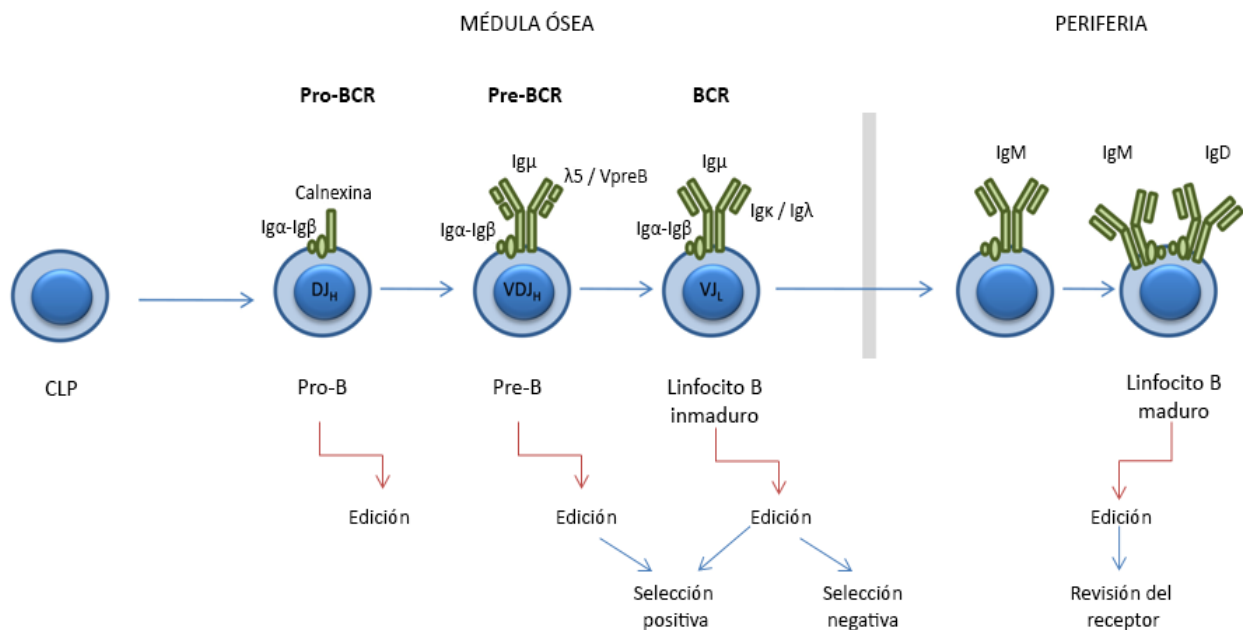


**Figura 1. Esquema del sistema hematopoyético**, desde las células madre hematopoyéticas pluripotentes (PHSCs) con capacidad de auto-renovación, hasta las células más especializadas, como los linfocitos B y T (Imagen a partir de diferentes *reviews*<sup>38-40</sup>).

A continuación, los linfocitos B pasan por diferentes fases, durante las cuales se desarrolla el **receptor de antígenos** (BCR) y pasamos de un linfocito pro-B a un linfocito inmaduro que abandona la médula (Figura 2).

Los linfocitos **pro-B** expresan una forma precursora del BCR, compuesta por las proteínas transductoras de señales, la inmunoglobulina  $\alpha$  (I $\alpha$ ) e I $\beta$ , y calnexina (**pro-BCR**)<sup>41,42</sup>. Durante este estadio se inicia la recombinación del segmento del gen de las inmunoglobulinas y se formará una cadena pesada completa (I $\mu$ ). La expresión de I $\mu$  marca la transición a la fase de célula pre-B<sup>43-45</sup>.





**Figura 2. Esquema de la diferenciación de los linfocitos B.** Representación de los tipos de receptor presentes en cada estadio de diferenciación y sus respectivos reordenamientos <sup>46,47</sup>.

En los linfocitos **pre-B**, la cadena pesada  $\mu$  se asocia a las proteínas  $\lambda 5$  y VpreB, también denominadas **cadenas ligeras subrogadas**, que son homólogas a las cadenas ligeras  $\kappa$  y  $\lambda$  pero que son invariables. Estos complejos forman el receptor de los linfocitos pre-B (**pre-BCR**) <sup>48-51</sup>. Cuando se forma el pre-BCR, el receptor envía señales para inhibir la reorganización de la cadena pesada del otro cromosoma, este fenómeno se conoce como **exclusión alélica** <sup>52-54</sup>. La exclusión alélica garantiza que todos los linfocitos B expresen un único receptor, manteniendo así la especificidad clonal <sup>55</sup>. En esta fase de la maduración, cada linfocito B también reorganiza el gen de la cadena ligera,  $\kappa$  o  $\lambda$ , y produce una proteína que reemplazará las cadenas ligeras subrogadas, esta se asocia a la cadena  $\mu$  sintetizada previamente para producir una proteína IgM completa <sup>56</sup>. El locus  $\kappa$  se reorganiza después de la reorganización de la cadena pesada y antes de la reorganización del gen  $\lambda$ , de manera que la producción de las cadenas ligeras  $\kappa$  inhibe la reorganización del locus  $\lambda$  <sup>57,58</sup>. El locus  $\lambda$  sólo

experimentará recombinación si no se puede producir una cadena ligera  $\kappa$  o en el caso que se dé edición del receptor, que veremos más adelante. Por tanto, un clon de linfocitos B individual puede producir sólo uno de los dos tipos de cadenas ligeras durante su vida, a eso se le denomina **exclusión isotípica** de las cadenas ligeras <sup>59</sup>.

La cadena ligera producida forma un complejo con la cadena pesada  $\mu$ , previamente sintetizada, y las moléculas de IgM ensambladas se expresan en la superficie celular asociadas a  $Ig\alpha$  e  $Ig\beta$  (BCR). En este momento los **linfocitos B inmaduros** abandonan la médula ósea y completan su maduración en los órganos linfáticos periféricos.

### 1.1.1. Selección positiva y negativa de los linfocitos

A lo largo del desarrollo de los linfocitos B se han descrito diferentes puntos de control, en los cuales se comprueba la competencia del nuevo receptor y se asegura la generación de linfocitos B maduros que expresen receptores que no reaccionen a antígenos propios y sean funcionalmente sensibles. Cuando un linfocito B no cumple alguno de estos dos requisitos deja la vía del desarrollo y entra en apoptosis en la médula ósea.

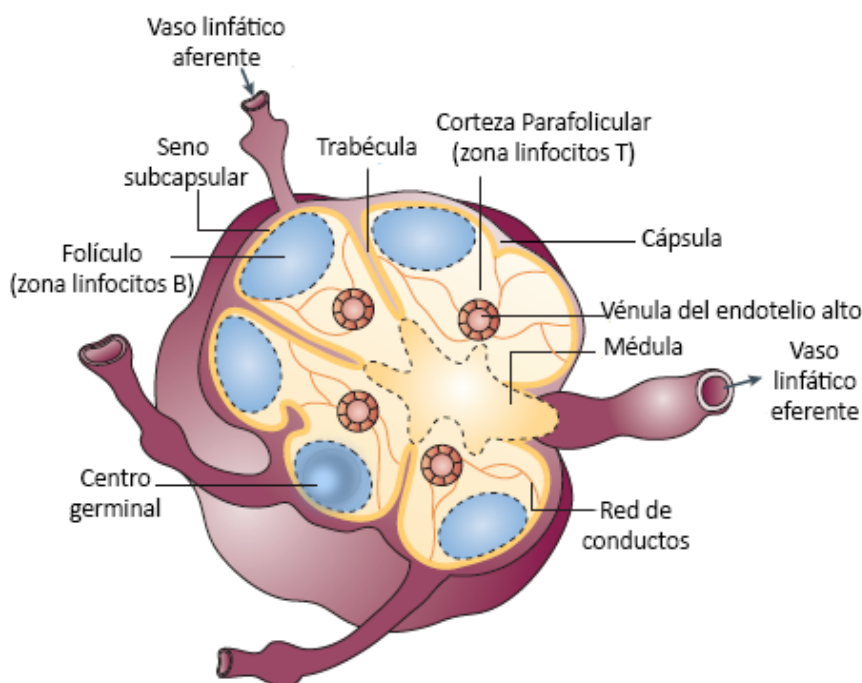
Los linfocitos B que expresan receptores defectuosos o auto-reactivos experimentan una reorganización secundaria de los genes de las inmunoglobulinas, para reemplazar este receptor antes de entrar en apoptosis. La expresión del receptor y su correcta cascada de señalización se conoce como **selección positiva** <sup>60,61</sup>, en cambio, cuando el BCR reconoce antígenos propios con elevada afinidad hablamos de **selección negativa** <sup>62</sup>. En ambos casos se produce **edición del receptor** (Figura 5A), que puede darse tanto en la cadena pesada como en la ligera de las inmunoglobulinas, aunque el proceso de cada una de ellas es distinto <sup>62</sup>.

## 1.2. Desarrollo dependiente de antígeno: Centro germinal

Los linfocitos B que han experimentado una correcta recombinación V(D)J y que expresan un BCR funcional, migran como **linfocitos vírgenes** de la médula ósea a los órganos linfáticos periféricos. El **centro germinal** se forma a partir de la proliferación de células B activadas en los folículos de los tejidos linfáticos <sup>63</sup>.

### 1.2.1. Formación del centro germinal

Los tejidos linfáticos están estructurados en **folículos primarios** que están compuestos mayoritariamente por linfocitos B vírgenes ( $IgM^+IgD^+$ ), separados entre ellos por la **región interfolicular** y limitando con los folículos tenemos el área rica en linfocitos T (conocida como **corteza parafolicular**) (Figura 3).

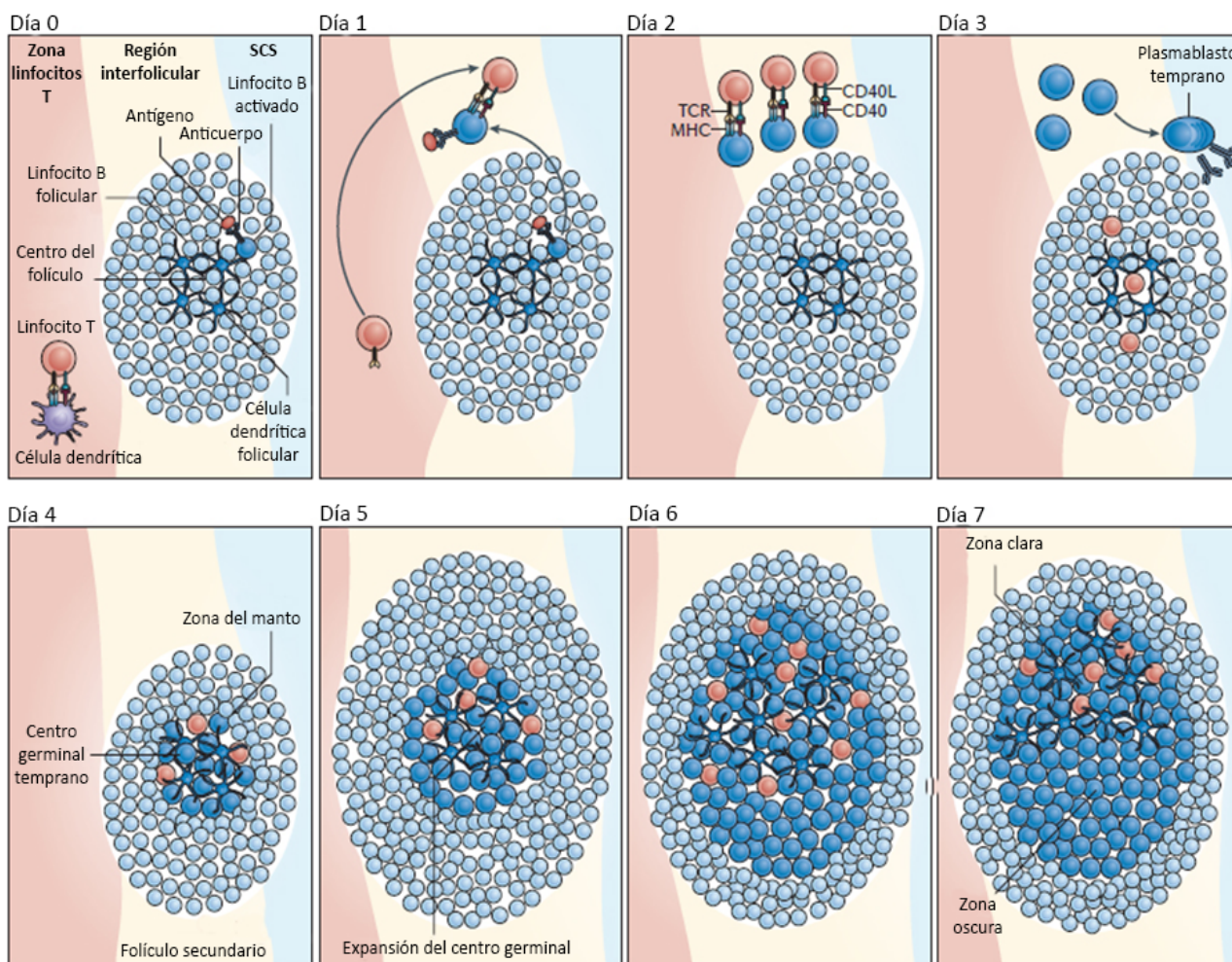


**Figura 3. Morfología de un ganglio linfático.** Dibujo esquemático de un ganglio linfático con las diferentes partes que lo forman <sup>64</sup>.

El primer paso para la formación del centro germinal es la activación de los linfocitos B vírgenes, producida por contacto con un antígeno externo dentro del folículo primario y la activación de los linfocitos T en la corteza parafolicular<sup>63,64</sup> (Figura 4). Una vez activados, tanto los linfocitos B como los T migran hacia la región interfolicular e interactúan. La interacción se da a través de dos pares de moléculas CD40L/CD40 y TCR/MHC, las primeras propias de los linfocitos T y las segundas de los linfocitos B<sup>65</sup>. A través de esta unión, los linfocitos B están totalmente activados y los linfocitos T adquieren el fenotipo de **linfocito T cooperador** ( $T_{FH}$ )<sup>66</sup>. El día 3 después de la inmunización, los linfocitos T cooperadores migran de la región interfolicular al interior del folículo. En este punto, algunas de las células B activadas se diferencian directamente a células secretoras de anticuerpos o células de memoria, en una región adyacente al seno subcapsular (SCS)<sup>67,68</sup>. El día 4 después de la inmunización, las células B que no siguen este proceso migran al centro del folículo, caracterizado por una densa red de células dendríticas foliculares, y empiezan a proliferar, lo que provoca un desplazamiento del resto de linfocitos B vírgenes que no se han diferenciado a la periferia, formando la **zona del manto**<sup>63</sup>. En este punto se inicia la formación del centro germinal rodeado por la zona del manto, esta estructura también se conoce como **folículo secundario**. A partir de aquí, 5-6 días después de la inmunización, los linfocitos B activados proliferan rápidamente provocando un aumento del tamaño del centro germinal, hasta el día 7, punto en el cual el centro germinal está completamente establecido y polarizado en dos microambientes, que se conocen como **zona oscura** y **zona clara**<sup>69</sup> (Figura 4).

La zona oscura está formada por un gran número de linfocitos B activados, conocidos como **centroblastos**, que proliferan en una red de células reticulares y expresan CXCL-12. Este tipo celular es parecido a las células dendríticas foliculares de la zona clara<sup>70</sup>. La zona clara no presenta tantos linfocitos B como la zona oscura (en este caso se denominan **centrocitos**) y está formada por otros tipos celulares como linfocitos  $T_{FH}$ , células dendríticas foliculares y

macrófagos <sup>69</sup>. La zona oscura y la zona clara del centro germinal, se organiza en base a la expresión de receptores de quimiocinas CXCR4 y CXCR5, respectivamente <sup>71</sup>.

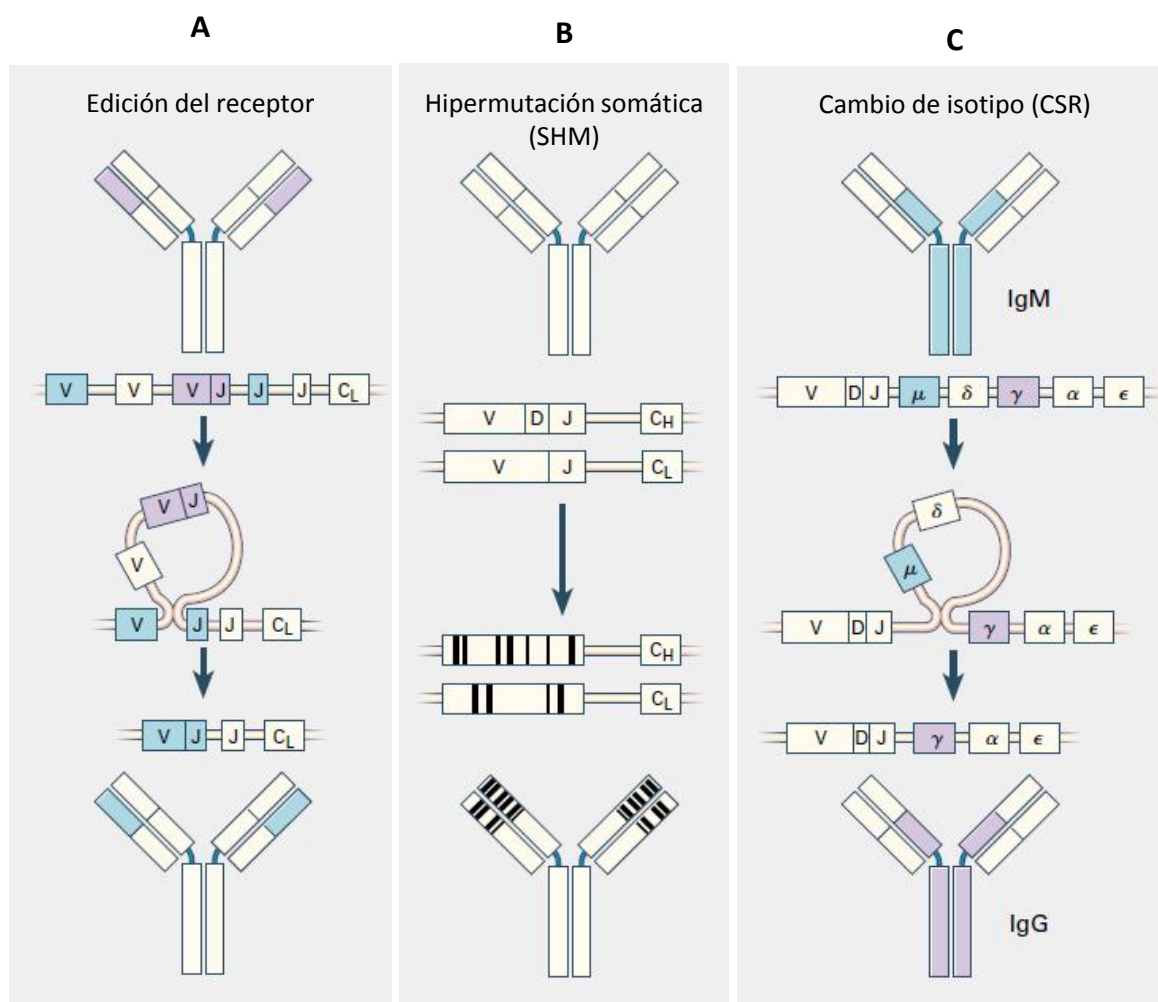


**Figura 4. Formación del centro germinal.** Esquema de los eventos que ocurren durante los 7 días posteriores al contacto con el antígeno, desde el folículo primario al folículo secundario, conduciendo a la formación del centro germinal y su polarización en dos microambientes: zona clara y zona oscura <sup>72</sup>. SCS, seno subcapsular.

### 1.2.2. Reacción del centro germinal

Los linfocitos B del centro germinal proliferan rápidamente en la zona oscura, donde se produce la hipermutación somática para diversificar aún más los genes de la porción variable de las inmunoglobulinas.

La **hipermutación somática (SHM)** es un proceso que modifica la región variable de las inmunoglobulinas de los linfocitos B durante la respuesta inmunitaria. La SHM está asociada a roturas de cadena del DNA y la introducción de cambios de un nucleótido <sup>73</sup>, pero también a pequeñas deleciones y duplicaciones <sup>74</sup>. La SHM produce diferentes clones de linfocitos B con un amplio rango de afinidades para reconocer al antígeno (Figura 5B).



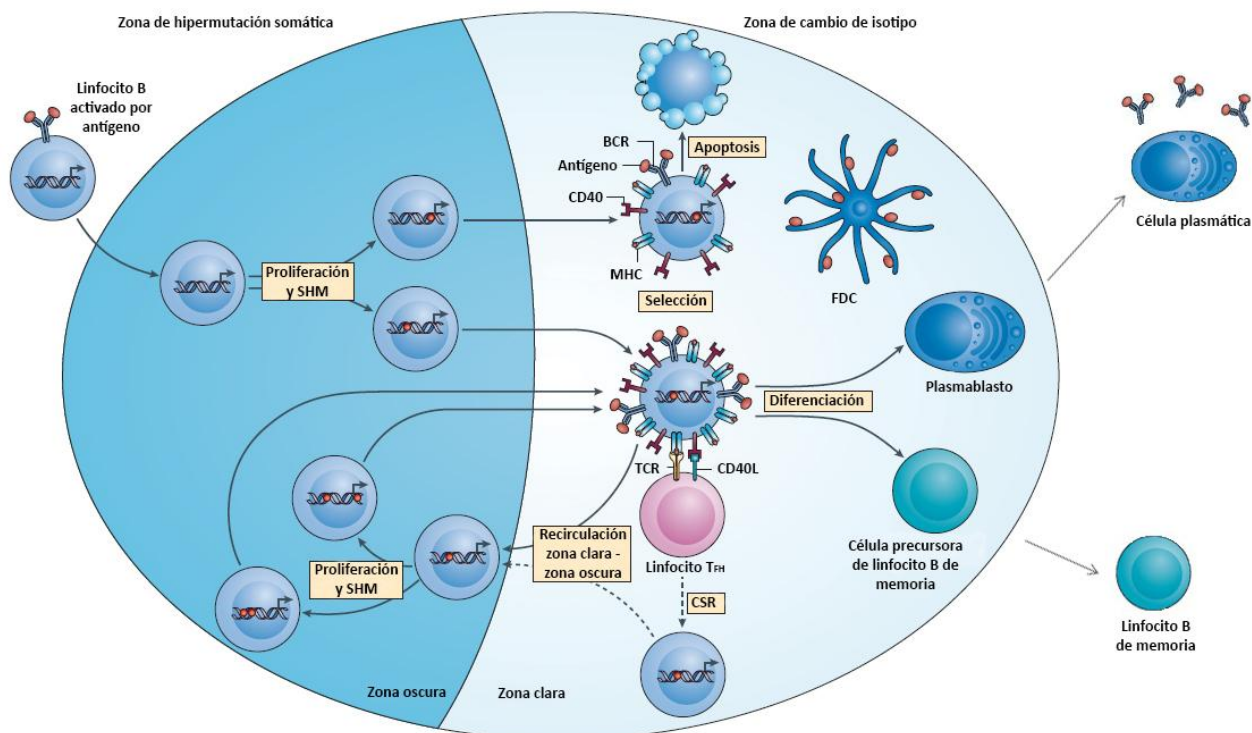
**Figura 5. Procesos moleculares que modifican los genes que forman las inmunoglobulinas.** (A) Edición del receptor, produciendo nuevas combinaciones de los segmentos génicos que forman los genes de las inmunoglobulinas. (B) Hipermutación somática (SHM), mutaciones puntuales que se producen para mejorar la afinidad con el antígeno. (C) Cambio de isotipo (CSR), proceso que cambia la clase o isotipo de los anticuerpos, pueden pasar de IgM a IgG, IgE o IgA, para cambiar su función efectora (Modificado <sup>75</sup>).

Seguido de la SHM en la zona oscura, los linfocitos B migran a la zona clara, donde los que tienen anticuerpos de elevada afinidad son seleccionados positivamente. Se ha demostrado que esta selección de los linfocitos B se produce principalmente por la competición directa del antígeno presentada por los linfocitos  $T_{FH}$ <sup>76,77</sup>. Además del papel fundamental de los linfocitos  $T_{FH}$ , la selección positiva de los linfocitos B en el centro germinal también está regulada limitando el acceso al antígeno, depositado en las células dendríticas foliculares<sup>76</sup>.

Una vez se ha producido la selección positiva, un grupo de linfocitos B de la zona clara entra de nuevo en la zona oscura (recircularización), mientras otros experimentan lo que se conoce como cambio de isotipo (CSR), antes de que se produzca la recirculación zona clara-zona oscura. En otros casos se produce el cambio de isotipo seguido directamente de la diferenciación<sup>78,79</sup>. Los linfocitos B generados en la zona clara del centro germinal que producen anticuerpos desfavorables incapaces de capturar suficiente antígeno, entran en apoptosis (Figura 6).

El **cambio de isotipo** (CSR) es un proceso, a nivel de DNA, por el cual los anticuerpos producidos por los linfocitos B activados cambian el isotipo de la cadena pesada, pasan de producir IgM e IgD a producir IgG, IgA o IgE. El cambio de isotipo cambia las funciones efectoras de los anticuerpos<sup>80</sup> (Figura 5C).

La recirculación entre estas dos zonas facilita varias rondas de mutación y selección de los clones. Después de este proceso, los centrocitos con receptores de elevada afinidad se diferencian a células plasmáticas o a células de memoria (Figura 6).



**Figura 6. Esquema de la reacción del centro germinal.** Procesos y recirculación que se produce en el centro germinal cuando se ha activado un linfocito B, para acabar produciendo células plasmáticas secretoras de anticuerpos o bien células de memoria <sup>72,81</sup>.

### 1.3. Regulación del desarrollo post-GC de los linfocitos B

Cuando los linfocitos B vírgenes encuentran un antígeno pueden diferenciarse a dos tipos celulares distintos: células plasmáticas o linfocitos B de memoria. Las células plasmáticas son las responsables de una respuesta rápida en la actual infección o desafío inmunológico, mientras que las células de memoria son las responsables de producir una respuesta rápida a los posteriores desafíos inmunológicos. Se requieren diferentes reguladores transcripcionales para mantener el programa de célula B, el de célula plasmática o el de linfocito B de memoria. Muchos de estos factores de transcripción específicos de una etapa reprimen los factores



necesarios en la etapa de desarrollo alternativa, estableciendo programas de expresión génica que se excluyen mutuamente.

Los procesos que inducen a los linfocitos B del centro germinal a diferenciarse a células plasmáticas o células B de memoria son bastante desconocidos, aparte de la señalización a través del BCR <sup>82</sup>, se han identificado algunos factores de transcripción de los cuales entraremos en profundidad en la siguiente sección.

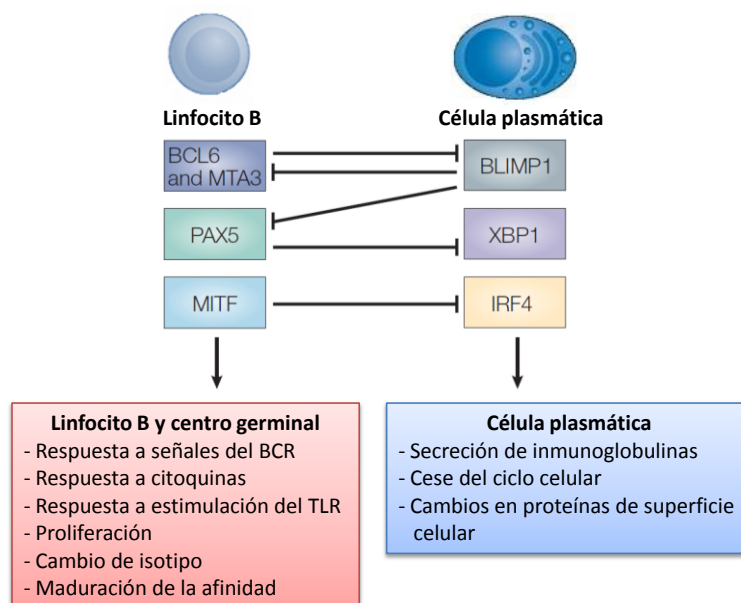
### 1.3.1. Célula plasmática

La diferenciación a célula plasmática requiere la inactivación y la activación de determinados factores de transcripción, permitiendo la transformación de linfocitos B maduros a células plasmáticas secretoras de anticuerpos. Se ha descrito, que es necesaria la expresión de factores de transcripción propios de las células plasmáticas (BLIMP-1, XBP-1 e IRF-4) y la inactivación de factores de transcripción que definen los linfocitos B del centro germinal (PAX-5, BCL-6 y MITF).

Para la diferenciación plasmocelular es necesaria la inactivación funcional del factor de transcripción **PAX-5**, esencial para mantener la identidad de linfocito B maduro, linfocito B virgen, linfocito del centro germinal y de célula de memoria <sup>83</sup>. La inhibición de PAX-5 lleva a la formación de un tipo celular conocido como “pre-plasmablasto”, capaz de secretar bajos niveles de anticuerpos <sup>84</sup>. Un segundo fenómeno es la regulación negativa de **BCL-6**, el cual termina el programa transcripcional de centro germinal y permite a los linfocitos B diferenciarse a células de memoria o células plasmáticas <sup>85</sup>. Además, BCL-6 es un factor de transcripción necesario para la generación del centro germinal <sup>86</sup>. Y el tercer factor que también requiere ser inactivado es **MITF**, imprescindible para mantener los linfocitos B

maduros en un estado de reposo e inhibe la expresión de factores de transcripción necesarios para la diferenciación plasmocelular <sup>87</sup>.

Por otro lado, es necesaria la expresión de **BLIMP-1**, se ha visto que la expresión exógena de BLIMP-1 induce la diferenciación plasmablástica de las células <sup>88</sup>. BLIMP-1 actúa por encima de **XBP-1**, factor necesario para desarrollar el fenotipo secretor de las células plasmáticas <sup>89,90</sup>. Y finalmente, es necesaria la expresión de **IRF-4**, regulador esencial de la diferenciación plasmocelular <sup>91,92</sup>. IRF-4 tiene un papel importante en la proliferación inicial de los linfocitos B maduros, donde no se requiere la participación de BLIMP-1 ni XBP-1 <sup>93</sup>. Se ha sugerido que este factor de transcripción actuaría por encima o en paralelo a BLIMP-1 en la generación de células plasmáticas <sup>91,92</sup>. Varios estudios concluyen que la expresión de BLIMP-1, XBP-1 e IRF-4 está regulada independientemente, pero los tres factores de transcripción son necesarios para completar la diferenciación a célula plasmática <sup>84</sup>. La deficiencia individual de alguno de estos factores tiene efectos dramáticos en el desarrollo plasmocelular de los linfocitos B <sup>89,91-93</sup> (Figura 7).



**Figura 7. Regulación de los factores de transcripción que definen los linfocitos B y las células plasmáticas.** Los factores de transcripción típicos de linfocitos B del centro germinal inhiben la expresión de los factores propios de las células plasmáticas. En el estadio de célula plasmática es BLIMP-1 el que reprime los genes propios del centro germinal <sup>94</sup>.

### 1.3.2. Linfocitos B de memoria

La regulación para el desarrollo de los linfocitos B de memoria está menos clara. Se ha sugerido que la fosforilación de **STAT-5** dirige la diferenciación mediante la regulación de la expresión de **BCL-6**<sup>95</sup>, el cual tiene un papel importante en el desarrollo de las células B de memoria<sup>96</sup>. El papel de STAT-5 en la generación de linfocitos B de memoria no está totalmente definido ya que existen resultados contradictorios en lo relativo a su función<sup>96-98</sup>.

Además, las células B de memoria continúan expresando **PAX-5**, de manera que, la inactivación o no de PAX-5 en las células del centro germina marca el destino final de estos linfocitos, hacia célula plasmática o hacia linfocito B de memoria.

Por último, la estimulación a través de **CD40** tiene un papel importante en la generación de linfocitos B de memoria. Pero queda aún por determinar si, la estimulación continuada dirige los linfocitos a través de la vía de linfocito B de memoria o, si la eliminación de la señalización es un pre-requisito necesario en la diferenciación a célula plasmática *in vivo*<sup>99</sup>.

### 1.3.3. BLIMP-1

El gen que codifica para **BLIMP-1**, también conocido como **PRDI-BF1** o **PRDMI**, se localiza en el cromosoma 6 (q21-q22.1)<sup>100</sup>. Este gen se transcribe a un factor de transcripción que regula una gran variedad de genes implicados en la diferenciación en múltiples líneas celulares.

BLIMP-1 es un miembro de la familia génica **PRDM**, la cual tiene entre 16-17 miembros en los mamíferos y que se caracteriza por la presencia de un dominio PR y un número variable de dedos de zinc. En el caso de BLIMP-1, este tiene 5 dedos de zinc con capacidad de unión al DNA, aunque parece que sólo los dos primeros son necesarios para unirse a las secuencias

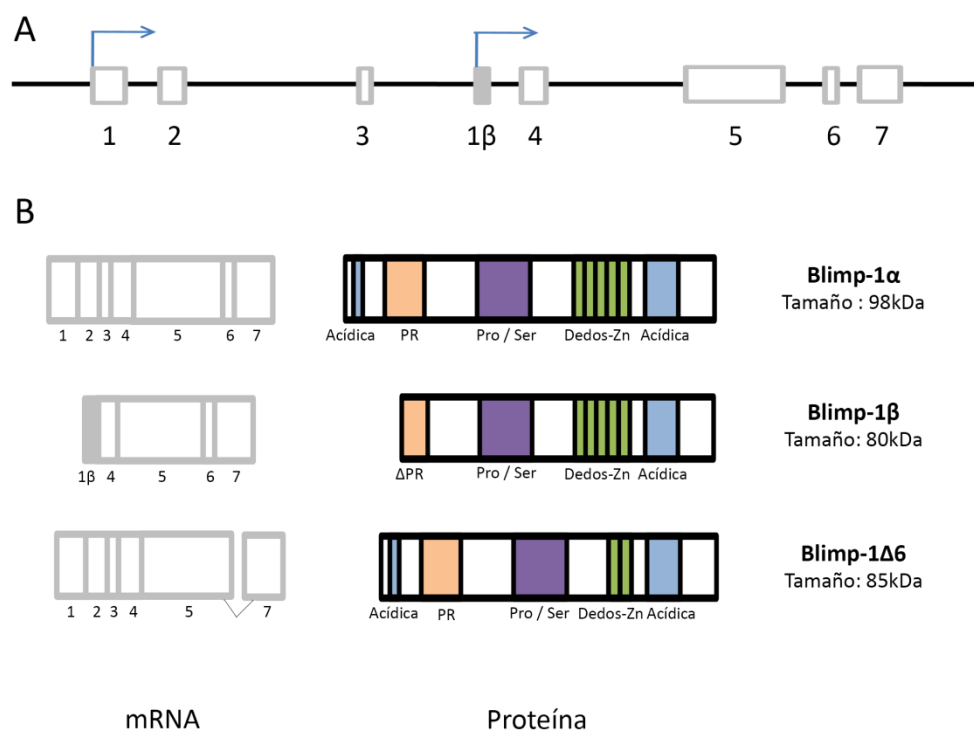
diana <sup>101</sup>. BLIMP-1 también contiene dos regiones ácidas (una en el extremo N-terminal y la otra en el C-terminal), una región rica en prolina y una secuencia PEST (Figura 8). El dominio PR tiene similitud con el dominio SET, un dominio catalítico que tiene actividad metiltransferasa, específica para residuos de lisina en las histonas H3 y H4 <sup>102</sup>. Aunque la forma activa de BLIMP-1 se ha considerado típicamente un monómero, se ha demostrado que BLIMP-1 puede dimerizar cuando está sobreexpresado <sup>103</sup>.

El gen *PRDM1* genera varias isoformas de la proteína, las dos isoformas mayoritarias, designadas como BLIMP-1 $\alpha$  y BLIMP-1 $\beta$ , surgen de promotores alternativos <sup>104</sup> (Figura 8). La forma completa de la proteína, BLIMP-1 $\alpha$  (98kDa), es responsable de la diferenciación a célula plasmática <sup>105,106</sup>. Por el contrario, BLIMP-1 $\beta$  (80kDa) se transcribe a partir de un nuevo promotor y contiene un exón adicional, 1 $\beta$ , que se localiza por delante del exón 4 de la forma completa <sup>104</sup>. Como consecuencia, la proteína BLIMP-1 $\beta$  ha perdido los primeros 101 aminoácidos de la isoforma BLIMP-1 $\alpha$  y contiene 3 nuevos, fusionando los aminoácidos 102-789 de la isoforma BLIMP-1 $\alpha$ . Como BLIMP-1 $\beta$  contiene el dominio de unión al DNA pero tiene el dominio regulador afectado, se ha sugerido que este podría inhibir las funciones de BLIMP-1 $\alpha$  <sup>104</sup>. En los linfocitos B normales, los niveles de mRNA de BLIMP-1 $\beta$  son considerablemente más bajos que los niveles de la forma completa <sup>104</sup>. La isoforma PRDM1 $\beta$ , la cual ha perdido la mayoría del dominio PR, tiene capacidad reducida de represión de los genes diana, sugiriendo que el dominio PR contribuye en la represión <sup>104</sup>.

En ratón, el exón 7 de *PRDM1* está sujeto a *splicing* alternativo, lo que conlleva a la producción de una proteína que ha perdido el segundo dedo de zinc, parte del primero y del tercero, de ahí, que se haya predicho que no es funcional <sup>107</sup>. Una isoforma similar se ha descrito en humanos, en este caso el exón sujeto a *splicing* alternativo es el exón 6, BLIMP-1 $\Delta$ 6 ( $\approx$ 85kDa) <sup>103</sup> (Figura 8). A pesar de la pérdida de unión al DNA, la expresión de la isoforma  $\Delta$ exon7 en ratón, afecta la proliferación y la apoptosis cuando se expresa en líneas

celulares B inmaduras y puede inhibir la actividad de la forma completa BLIMP-1 $\alpha$ , supuestamente por la formación de heterodímeros no funcionales. La isoforma BLIMP-1 $\Delta$ 7 se expresa preferentemente en los linfocitos B vírgenes, donde podría estar regulando los niveles de BLIMP-1 $\alpha$  para mantenerlos bajos durante esta etapa <sup>103</sup>.

Los genes de la familia *PRDM* codifican para diferentes isoformas de mRNA, estas isoformas alternativas codifican para proteínas que afectan la función de la otra isoforma <sup>104,108,109</sup>. Este mecanismo no sólo se ha descrito en la familia *PRDM*, sino también en otros factores de transcripción con motivos de dedos de zinc <sup>110-112</sup>.



**Figura 8. Isoformas de BLIMP-1 presentes en humanos.** A partir de dos promotores diferentes en el gen *PRDMI*, se generan 3 isoformas de mRNA de BLIMP-1 que se traducen a proteína. Cada una de las isoformas tiene unas características distintivas tanto morfológicas como funcionales (Imagen creada a partir de la modificación del *Review* <sup>113</sup>).

El gen *PRDMI*, homólogo en humanos y ratones, fue identificado primero en base a su implicación en la respuesta inmunitaria, la regulación de la producción de interferón  $\beta$  y la

diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas. Se vio que BLIMP-1 juega el papel principal en la regulación de la diferenciación funcional de los linfocitos B y T <sup>88,106,114</sup> y que también está implicado en la función mieloide <sup>115</sup>.

BLIMP-1 utiliza diferentes mecanismos para silenciar sus genes diana, los dominios de la proteína reclutan complejos co-represores específicos o enzimas modificadoras de cromatina para mediar la represión transcripcional. Se ha descrito que la región rica en prolina y los dedos de zinc están implicados en el reclutamiento de co-represores de la familia Groucho <sup>116</sup>. Además, BLIMP-1 forma complejos con la histona metiltransferasa G9a, a través de los dos primeros dedos de zinc, resultando en la metilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9) y en la represión del promotor del interferón- $\beta$  <sup>117</sup>. La región rica en prolina y los dedos de zinc, también interaccionan con las histonas deacetilasas (HDACs) 1/2 para deacetilar la histona H3 <sup>118</sup>; así como con una demetilasa específica de lisina, la LSD1, que demetila grupos mono- o dimetilo en H3K4 <sup>119</sup>. Se ha propuesto que el reclutamiento de las HDACs 1/2 y LSD1 es un pre-requisito para la metilación H3K9 y para el silenciamiento del programa de expresión génica de los linfocitos B durante la diferenciación a célula plasmática <sup>120</sup>.

BLIMP-1, como hemos visto anteriormente, es capaz de silenciar un conjunto de genes relacionados en el mantenimiento de la identidad de célula B, como CD20, PAX-5 y SPIB, entre otros <sup>121</sup>. Además, BLIMP-1 también inhibe genes esenciales para el CSR y la SHM <sup>121-123</sup>. El gen **CIITA** también se encuentra reprimido por BLIMP-1, produciendo una disminución de la expresión de los genes MHC de clase II y la presentación de antígenos en las células plasmáticas <sup>121,124,125</sup>.

Además, BLIMP-1 también disminuye la expresión de los genes relacionados con la proliferación celular, en parte, por la represión directa de la expresión de c-MYC <sup>121,126</sup>. Además, muchos de los genes diana de c-MYC también están regulados por BLIMP-1 <sup>127</sup>.

Quizás como consecuencia indirecta de la detención del ciclo celular, debido a la represión de c-MYC, también se ven afectados genes involucrados en la reparación y síntesis de DNA, y en la progresión del ciclo celular <sup>121</sup>. Aunque la represión de c-MYC es necesaria para que los linfocitos B salgan del ciclo celular y terminen la diferenciación a célula plasmática, la eliminación de c-MYC no es suficiente para desencadenar la diferenciación <sup>128</sup>.

Por otra parte, BLIMP-1 activa genes relacionados con la producción de anticuerpos y con la respuesta a estrés <sup>121</sup>. Esta inducción está regulada, en parte, por la inactivación de PAX-5 y la represión de sus dianas, como XBP-1 <sup>89,129,130</sup>, el gen de la cadena J <sup>131</sup> y el de la cadena pesada <sup>132</sup>. Por lo tanto, las células que expresan BLIMP-1 presentan un incremento en el mRNA total de las inmunoglobulinas <sup>129</sup>. BLIMP-1 también aumenta la expresión de CXCR4 y el receptor de integrinas VLA-4 <sup>129</sup>, ambos implicados en la migración de las células plasmáticas a nichos especializados de la médula ósea <sup>133</sup>.

## 2. LINFOMAGÉNESIS Y LINFOMAS NO-HODGKIN (NHLs)

De manera similar a la oncogénesis de los tumores sólidos, la linfomagénesis se considera un proceso con múltiples fases, en el cual la acumulación de alteraciones genéticas produce un crecimiento autónomo de las células linfoides en diferentes estadios de maduración, presentándose clínicamente como **leucemia** y/o **linfoma**. En este proceso, los mecanismos reguladores de la homeostasis que controlan el crecimiento linfocítico se descontrolan, resultando en la adquisición paulatina de las propiedades que se conocen como las “características del cáncer”: autosuficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a señales anti-crecimiento, escape de la apoptosis, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida e invasión de tejidos/metástasis <sup>134</sup>.

Los linfomas son un grupo heterogéneo de cánceres que derivan de los linfocitos en desarrollo, estos producen tumores predominantemente en las estructuras linfoides pero también en los tejidos extra-ganglionares. La Organización Mundial de la Salud (WHO) clasifica el linfoma en unas 100 entidades distintas, principalmente en base a la morfología, al inmunofenotipo, alteraciones genéticas y características clínicas <sup>135,136</sup>.

Los linfocitos B malignos utilizan diferentes mecanismos, presentes en los linfocitos normales, para mantener su crecimiento y supervivencia. Entre estos mecanismos tenemos la utilización de vías anti-apoptóticas o de supervivencia, como la vía NF- $\kappa$ B o la JAK2-STAT3 <sup>137-139</sup>; modificación o sobreexpresión de determinados factores de transcripción, sobre todo implicados en el control de la diferenciación y la activación de los linfocitos B, como BCL-6, IRF-4 o BLIMP-1 <sup>140-143</sup>; modulación de la expresión de determinados microRNAs que actuarían como oncogenes o supresores de tumores, como miR-150, miR-155 y la familia miR-17-92, entre otros <sup>144,145</sup>; desregulación epigenética, producida por ejemplo por



mutaciones en CREBBP, EP300 o en la H3K4 metiltransferasa MLL2/KMT2D<sup>144,146</sup>; y evasión inmunitaria, como por ejemplo por genes de fusión que contienen CIITA<sup>147</sup>.

Los linfomas no Hodgkin (**NHLs**) derivan de los linfocitos B (85-90%), T y las células NK de varios estadios de diferenciación. Los NHLs están formados por un gran grupo de neoplasias malignas con diferentes características genéticas, fenotípicas y clínicas. Estos representan el quinto tipo de cáncer más común, y aunque la WHO reconoce una gran variedad de entidades patológicas bien caracterizadas, existe un cierto nivel de superposición que todavía impide la asignación adecuada de algunos tumores<sup>136</sup>. Los análisis de expresión génica (GEP) han mejorado la precisión del diagnóstico y han encontrado nuevas dianas terapéuticas<sup>148,149</sup>.

El estadio de desarrollo de célula B al que pertenece cada tipo de linfoma es lo que se conoce como “célula de origen” (Figura 9). El linfocito B maduro pre-centro germinal es la célula de origen de la mayoría de casos de linfoma de células del manto (**MCL**), los cuales tienen la región variable (V) de las inmunoglobulinas sin mutación; un subtipo de linfoma linfocítico de células pequeñas (**SLL**) y su pariente leucémico, leucemia linfática crónica (**U-CLL**), que tiene las regiones V de las inmunoglobulinas no mutadas, aunque el perfil de expresión génica sugiere que ha estado en contacto con el antígeno<sup>150-152</sup>.

El centro germinal es el estadio de origen del **MCL** con mutaciones en la región variable de las inmunoglobulinas, del linfoma folicular (**FL**), el linfoma de Burkitt (**BL**) y del linfoma difuso de células grandes tipo centro germinal (**GCB-DLBCL**)<sup>153-155</sup>. Mientras que el subtipo activado de linfoma difuso de células grandes (**ABC-DLBCL**) se asemeja a los plasmablastos post-centro germinal<sup>153,154</sup>. El otro subtipo de CLL, tiene la región V de las inmunoglobulinas mutadas (**M-CLL**) y por eso deriva de los linfocitos post-centro germinal<sup>156</sup>. Los linfomas del tejido linfático asociado con la mucosa (**MALT**) son de origen extra-nodal y fenotípicamente se asemejan a las células B del manto post-centro germinal<sup>157</sup>. La leucemia

de células peludas (**HCL**) tiene mutados los genes de las inmunoglobulinas y se ha producido el CSR, esto junto el perfil de expresión génica indican que este linfoma se asemeja a las células B de memoria post-centro germinal <sup>158</sup>. Por último, un subtipo de linfoma que se origina en el timo y conocido como linfoma B primario mediastínico (**PMLB**), deriva de un subconjunto de linfocitos B raros que residen en este órgano <sup>159</sup>.

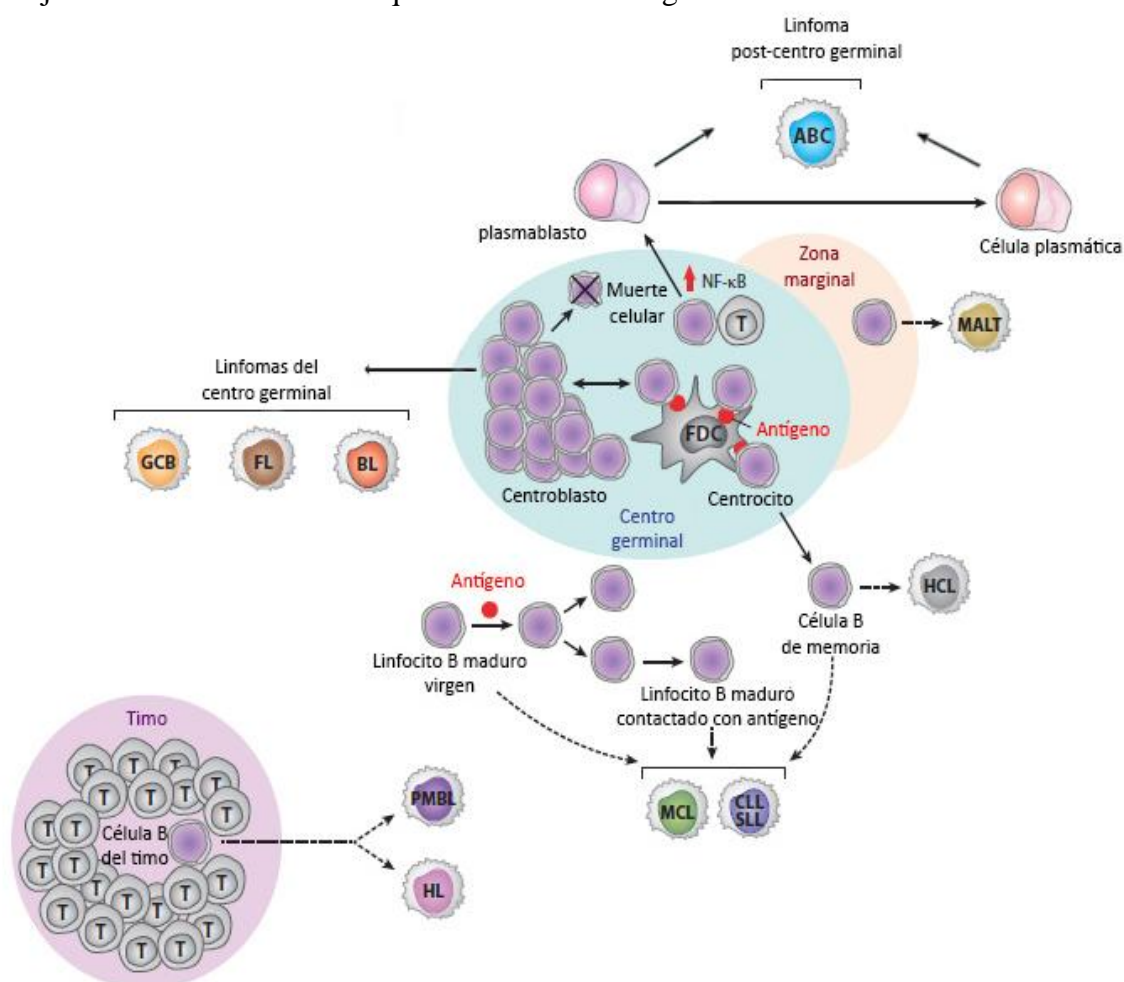


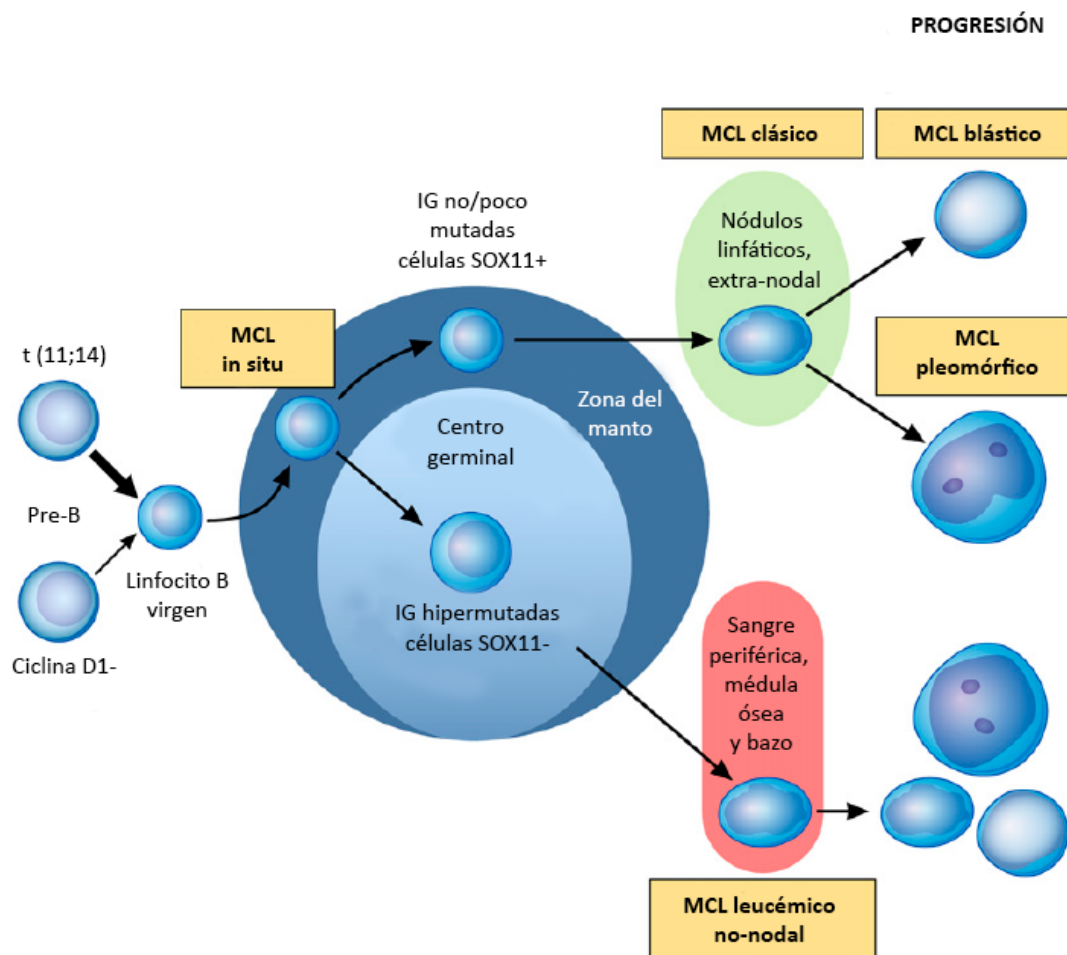
Figura 9. Célula origen de los diferentes tipos de linfomas no-Hodgkin <sup>160</sup>.

## 2.1. Linfoma de células del manto (MCL)

El linfoma de células del manto (MCL) es un subtipo no muy común de NHL, ya que representa alrededor de un 5-6% de todos los casos. El MCL tiene una incidencia de 0.5 pacientes por cada 100.000 habitantes en los países occidentales. La edad media del diagnóstico es de 68 años, tiene más incidencia en hombres que en mujeres y la supervivencia

media es de 5-7 años con las terapias actuales. En el caso del MCL hay más de una opción sobre la célula origen del linfoma que da lugar a diferentes tipos de MCL. Uno de los orígenes es a partir de los linfocitos B vírgenes, son los MCL que no tienen mutaciones, o tienen muy pocas, en la región variable de las inmunoglobulinas, es el subtipo **clásico** de MCL. El MCL clásico afecta normalmente los nódulos linfáticos y otras regiones extra-nodales. Mutaciones adicionales en este subtipo de MCL pueden llevar a un subtipo más agresivo, que se conoce como MCL **blástico** o **pleomórfico**. En cambio aquellos casos que tienen una elevada tasa de mutación provienen de células que han pasado por el centro germinal y conducirán a la variante de MCL **leucémica no-nodal**, que afecta normalmente la sangre periférica, la médula ósea y a menudo el bazo. Estos casos normalmente son clínicamente indolentes, pero pueden darse anomalías secundarias, a menudo en TP53, produciendo una mayor agresividad de la enfermedad. Finalmente, hay la neoplasia de células del manto *in-situ* (**ISM CN**), que es aquella que tiene una baja tasa de progresión y que se caracteriza por la presencia de células ciclina D1 positivas. La ISM CN se encuentra típicamente en la zona del manto de los folículos, en los tejidos linfoides, por lo que a menudo se detecta accidentalmente y a veces en asociación con otros linfomas<sup>136,161,162</sup> (Figura 10). Se ha descrito en diferentes estudios que el MCL tiene ocasionalmente áreas con diferenciación plasmablástica<sup>1,2,7,136</sup> (Figura 10).

La característica principal del MCL es la translocación t(11;14)(q13;q32), por la cual el gen de ciclina D1, *CCND1* (11q13), es translocado en uno de los locis de la cadena pesada de las Igs (14q32), produciendo una sobreexpresión constitutiva de ciclina D1. La ciclina D1 se une a las quinasas 4 y 6 dependientes de ciclina (CDK4/6) y provoca la desregulación del ciclo celular en la transición G1/S<sup>163,164</sup>. Se ha visto que la sobreexpresión de esta ciclina no es suficiente para explicar la generación del linfoma, así que son necesarias alteraciones genéticas secundarias para poder explicar el comportamiento agresivo de esta enfermedad<sup>163</sup>.



**Figura 10. Representación de los diferentes orígenes del MCL.** Uno de los orígenes sería aquel que deriva de células sin o con pocas mutaciones en las Igs y el otro modelo sería el que deriva de linfocitos B que han pasado por el centro germinal y que por lo tanto tienen mutaciones en las Igs <sup>163</sup>.

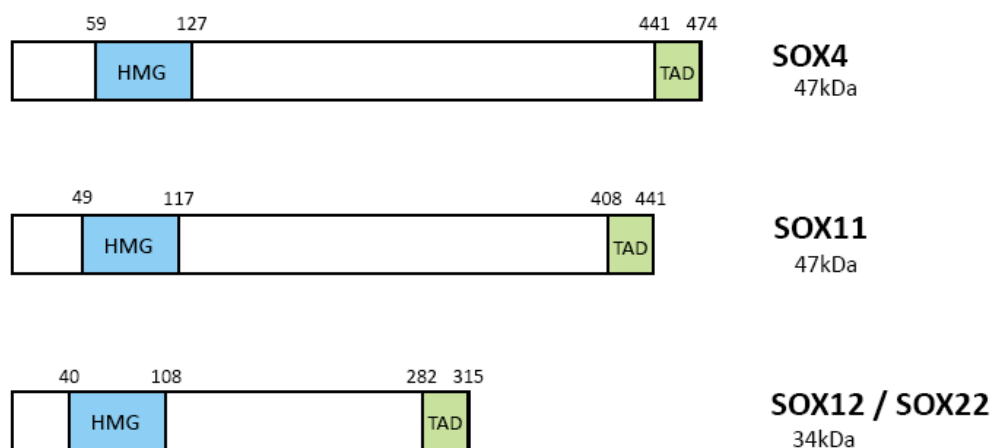
La patogénesis del MCL es compleja y se ven afectadas diferentes vías, como genes relacionados con elementos reguladores del ciclo celular y senescencia (ARF, BMI1, CDK4, CDKN2A, RB1), vías de respuesta al daño en el DNA (ATM, CHK2, p53) y señales de supervivencia celular. Además, también se han visto afectados genes que regulan otras vías de señalización, con un papel fundamental en la patogénesis del MCL: BTK, AKT, mTOR, WNT, NF- $\kappa$ B y NOTCH <sup>165</sup>.

Aunque el MCL es considerado generalmente como agresivo, no todos los pacientes requieren de terapia inmediata. El MCL se clasifica en dos formas diferentes: convencional e indolente. La forma **convencional** (90% de los casos) es SOX11 positiva, presenta nula o mínima SHM de IGVH e inestabilidad genética; y la forma **indolente** es SOX11 negativa y deriva de células post centro germinal, por ello tienen hipermutación de IGVH y estabilidad genética<sup>8-10</sup>. El MCL indolente tiene un curso clínico indolente con una supervivencia mayor a 10 años<sup>166</sup>. Para el diagnóstico de MCL se requiere normalmente la detección de la t(11;14)(q13;q32) o de la sobreexpresión de ciclina D1 (90% de los casos). Una pequeña proporción de los casos tienen todas las características de MCL pero son ciclina D1 negativos<sup>167</sup>, una proporción de estos presentan translocaciones que implican los genes *CCND2* y *CCDN3*<sup>167,168</sup>. En cambio, SOX11 se expresa en el 78-100% de los casos de MCL, incluyendo aquellos que son ciclina D1 negativos<sup>12-15</sup>. Los pacientes ciclina D1 negativos eran difíciles de diagnosticar anteriormente debido a que no existía un marcador predictivo o pronóstico de este subgrupo, de manera que la expresión de SOX11 es un buen marcador de diagnóstico y de pronóstico. El potencial de SOX11 se ha visto en el comportamiento agresivo del MCL, ya que es uno de los genes altamente expresados en los tumores que requieren de tratamiento en el momento del diagnóstico, comparado con los casos con un curso clínico indolente<sup>10</sup>. Además, se ha visto que la gran mayoría de MCL sobreexpresan SOX11, pero está ausente en el resto de linfomas de células B, con la excepción de algunos casos de BL<sup>13,14,169</sup>.

Además de la expresión de SOX11, también se han descrito mutaciones en NOTCH1/2 (5-10% de los pacientes) que se relaciona con la agresividad clínica del MCL y mutaciones en BIRC3 que aparecen durante la progresión del tumor y que no se encuentran en el momento del diagnóstico<sup>170</sup>.

### 2.1.1. SOX11

Los genes **SOX** se dividen en 8 grupos diferentes de acuerdo con el grado de homología de su dominio de alta movilidad (HMG) <sup>171</sup>. **SOX11** es un factor de transcripción relacionado con la regulación del desarrollo embrionario y que pertenece a la familia de genes **SOXC**. Esta familia de genes está formada por **SOX4**, **SOX11** y **SOX12** (también conocido como **SOX22**) <sup>172-174</sup>. Todos ellos están formados por un único exón y están altamente conservados a lo largo de la evolución de los vertebrados <sup>16</sup>. En humanos, las proteínas de los genes **SOX4**, **SOX11** y **SOX12** tienen 474, 441 y 315 aminoácidos, respectivamente. Todos estos genes tienen dos dominios funcionales: caja **HMG** relacionada con **Sry** (**SOX**), de unión al DNA, localizada en la mitad N-terminal; y un dominio de transactivación (**TAD**) localizado en el extremo C-terminal <sup>17</sup> (Figura 11).



**Figura 11. Estructura de las proteínas de la familia SOXC.** Representación de la estructura y los dominios funcionales (con los aminoácidos correspondientes) de los diferentes miembros de la familia SOXC: **SOX4** (47kDa), **SOX11** (47kDa) Y **SOX12/22** (34kDa) (Modificado <sup>175</sup>). HMG, grupo de alta movilidad; TAD, dominio de transactivación.

SOX11 es un factor de transcripción que no se encuentra en las células B normales, pero que tiene efectos pleiotrópicos en el MCL, incluyendo diferenciación, proliferación y apoptosis <sup>11</sup>. Una de las principales dianas de SOX11 en el MCL es PAX-5, a través del cual inhibe la diferenciación plasmocelular de los linfocitos B <sup>11</sup>. Además, se ha visto que SOX-11 actúa a través de PDGFA para inducir angiogénesis tumoral y promoviendo el crecimiento del linfoma <sup>176</sup>.

### 2.1.2. Tratamiento del MCL

Actualmente existen diferentes opciones y combinaciones de tratamiento para el MCL, pero no hay un tipo de atención estándar aceptada universalmente. En los últimos años, se ha visto un incremento de los estudios que buscan dianas terapéuticas implicadas en los mecanismos moleculares relacionados con la patogénesis del MCL. Muchos de estos agentes terapéuticos tienen una prometedora acción en los estudios pre-clínicos y en los ensayos clínicos. Entre estos agentes tenemos, inhibidores del CDK, inhibidores del BCR, inhibidores de mTOR, inhibidores de PI3K, inhibidores de AKT, inhibidores de HSP90, inhibidores del proteasoma, inhibidores de PARP, inhibidores de la vía JAK/STAT, inhibidores de las HDAC, inhibidores de la quinasa PIM e inhibidores de BCL-2, entre otros <sup>177</sup>.

En los pacientes con un estadio temprano (I-II), el tratamiento que se aplica es radioterapia <sup>178-180</sup>. No obstante, los pacientes que sólo han recibido radioterapia a menudo recaen durante el primer año <sup>178</sup>. En estos pacientes se da quimioterapia como terapia de primera línea, seguida por una consolidación con radioterapia <sup>178,181</sup>. La combinación de bendamustina con rituximab (anti-CD20) produce una remisión completa de estos pacientes, con efectos secundarios mínimos <sup>182,183</sup>. En cambio, en los pacientes con estadio tardío (III-IV) son

tratados después del diagnóstico, tanto si presentan síntomas como si no los presentan. En estos casos el tratamiento del MCL está adaptado individualmente, basándose en la edad, síntomas y factores de riesgo del paciente <sup>184,185</sup>.

En la terapia de primera línea con estrategias intensivas, se ha visto en múltiples estudios que el tratamiento con R-CHOP (rituximab, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona) es inferior a muchos otros regímenes y al régimen con VR-CAP (bortezomib, rituximab, ciclofosfamida, doxorubicina y prednisona) <sup>186</sup>. Para la terapia de consolidación, el trasplante de células madre seguido por un régimen de quimioterapia es el procedimiento habitual <sup>187,188</sup>. Nuevos fármacos como el temsirolimus (inhibidor de mTOR), el ibrutinib (inhibidor de la quinasa BTK) y la lenalidomida (componente inmunomodulador) se han probado como fármacos para la terapia de consolidación <sup>178</sup>. Y por último, la terapia de mantenimiento, en la que normalmente se utiliza rituximab para todos los estadios de MCL. El rituximab se ha utilizado solo y en combinación con otros fármacos más nuevos, las combinaciones han conseguido una remisión completa (CR), una supervivencia libre de progresión (PFS) y una mejora en la supervivencia global (OS) en todos los pacientes <sup>189</sup>. La lenalidomida, la cual ha sido utilizada primero en la terapia de primera línea, ha sido también evaluada para la terapia de mantenimiento, sola o en combinación con otros fármacos, principalmente rituximab <sup>190,191</sup>.

En la Unión Europea se ha aprobado la utilización de 4 nuevos fármacos (temsirolimus, bortezomib, lenalidomida y ibrutinib) para los pacientes con recaída o MCL refractario. En los ensayos clínicos iniciales, se ha visto que la utilización individual de estos agentes tiene una tasa de respuesta global (ORR) del 33% para el bortezomib, un 28% para la lenalidomida, un 22% para el temsirolimus y un 68% para el ibrutinib <sup>192-196</sup>. En el caso de la lenalidomida, se ha visto un aumento de la actividad del fármaco, en los pacientes con recaída, cuando se utiliza conjuntamente con rituximab <sup>197</sup>. Además, la combinación de ibrutinib con rituximab



ha conseguido una tasa de respuesta global del 80% y una remisión completa del 44% en estos pacientes <sup>198</sup>. Los estudios actuales se están centrando en el estudio de estos nuevos fármacos y la mejor combinación para el tratamiento del MCL.

## 2.2. Leucemia linfática crónica (CLL)

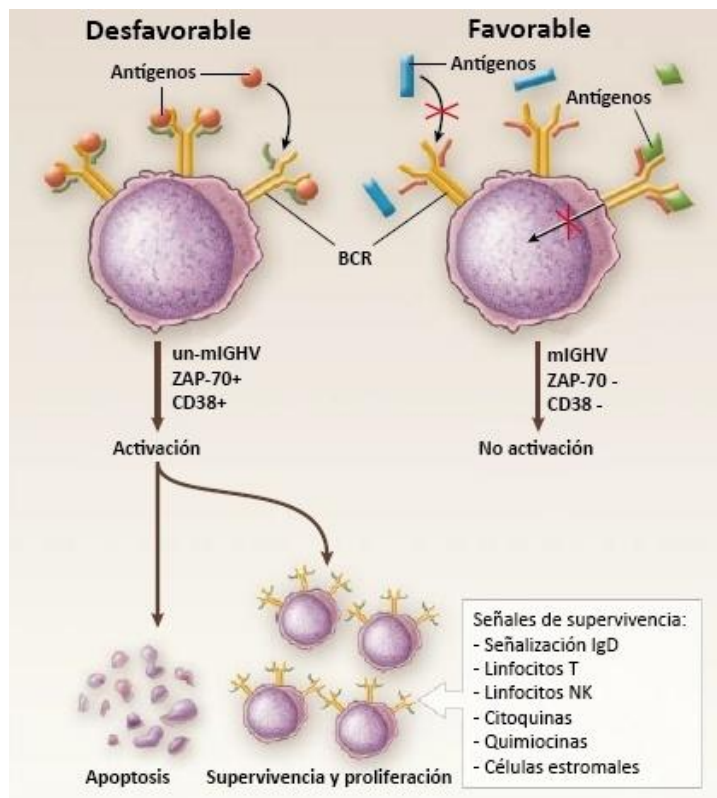
La leucemia linfática crónica (CLL) es una neoplasia hematológica maligna con una marcada heterogeneidad clínica, debido en parte a las alteraciones genéticas de las células leucémicas <sup>199-201</sup>. La CLL es la leucemia adulta más común en los países occidentales y principalmente afecta a individuos mayores de 50 años <sup>202</sup>. La principal característica morfológica es la acumulación clonal de linfocitos B pequeños con apariencia madura en la sangre, la médula ósea, los nódulos linfáticos y otros tejidos linfáticos <sup>203</sup>. Esta enfermedad tiene una elevada predisposición genética, con un riesgo estimado de 2-7 veces superior en familiares de primer grado de pacientes con CLL. La CLL tiene un repertorio distintivo de marcadores inmunológicos que le permiten diferenciarse de los otros linfomas de células B <sup>204</sup>. Estudios de FISH han determinado que la presencia de la translocación t(11; 14)(q13; q32) que produce un reordenamiento de *BCL-1/ciclina D1*, o la t(14;18) con reordenamiento de *BCL-2*, son útiles para distinguir la CLL del MCL y el FL, respectivamente <sup>205</sup>.

Recientemente se ha establecido que la CLL es una enfermedad con mucha diversidad, han sido identificadas diferencias en la morfología celular, inmunofenotipo, citogenética y características moleculares. Esta heterogeneidad se traduce en el curso clínico y la respuesta al tratamiento <sup>206</sup>. Aproximadamente un tercio de los pacientes sobrevive durante 20 años o más sin necesidad de tratamiento <sup>207</sup>, en cambio algunos pacientes progresan rápidamente desde el momento del diagnóstico y experimentan complicaciones, como anemia hemolítica

autoinmune, trombocitopenia e infección. Por otra parte, un 3-10% de los casos pueden desarrollar un linfoma agresivo durante el transcurso de la enfermedad, el cual se describió originalmente como “síndrome de Richter”<sup>208</sup>. La CLL puede sufrir una transformación a leucemia prolinfocítica, con peor resultado clínico en la mayoría de los casos. Esta transformación se asocia frecuentemente con anomalías de p53<sup>209</sup>, y algunas veces con c-MYC<sup>210</sup>.

Aunque la CLL se caracteriza por tener un genoma relativamente estable y la mayoría de las CLL parecen tener pocas aberraciones cromosómicas, un elevado número de aberraciones en el número de copias (CNAs) (más de 3 por paciente) denominado complejidad genómica, se ha detectado en una porción de pacientes de CLL (aproximadamente el 20%). La complejidad genómica demarca un subconjunto de CLLs con enfermedad progresiva y agresiva, corta supervivencia, y menor eficacia terapéutica<sup>211-213</sup>.

El mayor suceso en la caracterización genómica de la CLL fue su división en dos grupos, dependiendo de si las células tumorales habían experimentado la SHM en el centro germinal, permitiendo distinguir los casos con mutaciones en la región variable de las inmunoglobulinas (mIGHV) y en los casos ausentes de mutaciones (un-mIGHV)<sup>81</sup>. Los pacientes con la región variable mutada tienen una supervivencia media de más de 24 años, mientras que los pacientes con la región variable con pocas o sin mutaciones tiene una supervivencia media de 8-9 años<sup>150</sup>. Los pacientes con un-mIGHV tienen un riesgo mayor de recaída después de un trasplante de células madre<sup>214</sup>, y se ha visto que la transformación de Richter ocurre casi exclusivamente en este grupo de pacientes<sup>215</sup>. Además, estos pacientes son más propensos a una evolución clonal, con una mayor tendencia a adquirir anomalías citogenéticas con mal pronóstico (Figura 12).



**Figura 12. Tipos de CLL según un conjunto de marcadores y su factor pronóstico.** La CLL que tiene un-mIGHV como positiva para ZAP-70 y CD38 son marcadores de pronóstico desfavorable en comparación con la CLL con mIGHV y negativa para ZAP-70 y CD38 <sup>199</sup>.

La presencia de anomalías citogenéticas es uno de los puntos más importantes de la CLL <sup>216,217</sup>. Las anomalías cromosómicas desfavorables (deleciones de 11q y 17p) ocurren más frecuentemente en los pacientes con un-mIGHV, mientras que las anomalías cromosómicas favorables (deleción sólo de 13q) son más frecuentes en los pacientes con mIGHV. Esta distribución desequilibrada de las anomalías cromosómicas enfatiza los diferentes antecedentes biológicos de los subgrupos de CLL, con o sin mutación, pero sólo en parte explica las diferencias en el curso clínico de la enfermedad <sup>218</sup>.

La expresión de CD38 de los linfocitos leucémicos fue el primer marcador que se encontró que correlacionaba con las mutaciones en la *IGHV*<sup>150</sup>. Con el tiempo, sin embargo, se encontró que la relación no es absoluta y que, de acuerdo con algunos estudios, la expresión de CD38 puede variar a lo largo del tiempo. De manera que la expresión de CD38 y las mutaciones de *IGHV* son factores pronósticos independientes<sup>151,219</sup> (Figura 12).

Los perfiles de expresión génica demostraron que ZAP-70 era el gen que más rigurosamente separaba los dos subconjuntos de CLL, las mutadas de las no-mutadas<sup>152</sup>. De manera que, altos niveles de expresión de ZAP-70 predice los casos con curso clínico desfavorable en términos de progresión de la enfermedad y de OS<sup>220</sup>. De hecho, la expresión de la proteína ZAP-70 parece tener un mayor valor predictivo que la mutación de las inmunoglobulinas, con una expresión constante a lo largo de la enfermedad<sup>221</sup> (Figura 12).

Recientemente, las técnicas de secuenciación masiva (NGS) han proporcionado un mejor conocimiento de la complejidad genética y la heterogeneidad de la CLL. Se han encontrado recurrentemente mutadas dos vías inesperadas en la CLL: la activación de la señalización de NOTCH1, por delección de un dinucleótido CT y otras mutaciones adicionales<sup>222-224</sup> y defectos en la maquinaria de *splicing* (mutación Y623C, R625H, N626Y, H662D, T663I, K666E, K700E, V701F, K741N, G742D y D894G de *SF3B1*)<sup>225,226</sup>, que desempeñan un papel destacado en el desarrollo de subconjuntos específicos de CLL. Otros estudios han encontrado mutaciones inactivadoras de *BIRC3*<sup>227</sup>, estas mutaciones, juntamente con delecciones de *BIRC3*, son recurrentes y se asocian con expresión normal de TP53. La identificación de mutaciones en *SF3B1* y *BIRC3* en este subgrupo de pacientes ha ayudado a aclarar las bases moleculares de esta fracción de pacientes de CLL de alto riesgo, que sigue siendo incierto dada la ausencia de alteraciones en *TP53*. Estos genes pueden ser marcadores moleculares para la identificación temprana de la resistencia a la quimioterapia entre los pacientes de CLL.

La delección más común en la CLL afecta el locus 13q14.3<sup>216</sup>, que contiene un gen que no se transcribe<sup>228</sup> y dos genes que codifican para microRNAs<sup>229</sup>. Uno de ellos miR-15a/16-1 que se encuentra delecionado o poco expresado en el 68% de los pacientes de CLL. La frecuencia de esta delección implica que esta confiere una ventaja selectiva, posiblemente predisponiendo los linfocitos B a mutaciones adicionales<sup>230</sup>. Se ha encontrado que estos microRNAs tienen como diana el mRNA codificante para la proteína anti-apoptótica BCL-2, la cual es crítica para la supervivencia de la célula de CLL<sup>231</sup>. Los subtipos de CLL también se han clasificado por el perfil de expresión de los microRNAs, estos patrones podrían actuar como biomarcadores pronósticos sustitutivos en CLL, ya que los niveles de expresión de estos microRNAs se correlacionan con el estado de mutación de *IGHV* o la expresión de ZAP-70<sup>230,232,233</sup>.

Por último, el DNA de los pacientes de CLL esta globalmente hipometilado cuando lo comparamos con el DNA de las células mononucleares de la sangre periférica de individuos sanos<sup>234</sup>. No obstante, la expresión de los genes supresores de tumores esta comúnmente silenciada por la hipermetilación de sus promotores<sup>235</sup>. La hipometilación de genes específicos también se ha descrito en CLL<sup>236-238</sup>. Los valores de metilación del DNA se han visto como factores de predicción independientes de la progresión de la CLL<sup>239</sup>, y se han descrito diferencias en los perfiles de metilación global entre los subgrupos pronósticos<sup>240</sup>. Es de destacar, que un estudio muy reciente integra la secuenciación de todo el epigenoma y el genoma de pacientes con CLL<sup>241</sup>.

### 2.2.1. Tratamiento de la CLL

En la CLL, se inicia el tratamiento cuando hay una pronunciada anemia o trombocitopenia asociada a la enfermedad, una linfadenopatía sintomática y/o síntomas asociados con actividad de la enfermedad. Actualmente, la presencia de del(17p) o mutación en *TP53*, son las características principales que determinan la terapia escogida. Cada vez más, el estatus mutacional de *IGHV* se considera un parámetro para determinar el tipo de terapia a escoger. El tratamiento de la CLL puede incluir quimioterapia, una combinación de quimioterapia e inmunoterapia, o fármacos para determinadas dianas que afectan cascadas de señalización que promueven el crecimiento y/o supervivencia de las células tumorales <sup>242,243</sup>.

La quimioterapia ha sido el tratamiento principal de la CLL durante los últimos 50 años, para ello se han utilizado análogos de purinas, como la fludarabina, pentostatina o cladribina; y agentes alquilantes, como el clorambucilo, ciclofosfamida o bendamustina <sup>244-246</sup>. Se han realizado tres ensayos clínicos en fase III para validar el beneficio de la utilización de anticuerpos monoclonales anti-CD20, como el rituximab, el obinutuzumab o el ofatumumab, en combinación con la quimioterapia para el tratamiento de la CLL <sup>247-249</sup>. Como resultado de estos estudios, se ha aprobado la utilización de estos fármacos en combinación con la quimioterapia como tratamiento de primera línea en los pacientes de CLL. Además, el ofatumumab ha sido aprobado como agente único para el tratamiento de pacientes con recaída o enfermedad refractaria <sup>250</sup>. Algunos de los pacientes pueden experimentar un aumento de la PFS siguiendo un tratamiento con fludarabina, ciclofosfamida y rituximab, particularmente aquellos pacientes de CLL con *IGHV* mutadas que tienen del(17q) o del(11q), características relacionadas con resistencia a la quimioterapia o corta PFS, respectivamente. Estos pacientes consiguen un beneficio a largo plazo con la quimioinmunoterapia <sup>251-253</sup>.

También se han estudiado los inhibidores de la señalización del BCR como terapia para la CLL, como inhibidores de BTK, PI3K y SYK <sup>254,255</sup>. Se ha descrito que, las células de CLL con las *IGHV* no mutadas son más sensibles a los inhibidores de la señalización del BCR <sup>256</sup>. En Estados Unidos y en Europa, se ha aprobado la utilización del ibrutinib, inhibidor de BTK, como terapia inicial y en pacientes con recaída. Se ha visto en los ensayos que ibrutinib tiene una mayor respuesta, una mayor PFS y una mayor OS que los pacientes tratados con ofatumumab <sup>257,258</sup>. No obstante, el ibrutinib presenta varios efectos adversos, y por ello se están evaluando en ensayos clínicos la segunda generación de inhibidores de BTK, para determinar si alguno de ellos tiene un índice terapéutico mayor que el ibrutinib <sup>259,260</sup>. Además, también ha sido aprobado en Estados Unidos y en Europa el idelisib, un inhibidor de PI3K, para el tratamiento de pacientes con recaída de CLL <sup>261</sup>.

Finalmente, otro tipo de fármaco que ha sido aprobado por la FDA es el venetoclax, inhibidor de BCL-2, un fármaco muy potente que produce la apoptosis de las células de la CLL <sup>262</sup>. Se ha visto que el venetoclax es efectivo en el tratamiento de pacientes con recaída o con CLL refractaria <sup>263</sup>; además de en pacientes con recaída y que tienen la del(17p), donde fue aprobada su utilización <sup>264</sup>.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**







Muchos de los linfomas malignos presentan un bloqueo en la maduración normal de los linfocitos B, siendo este bloqueo incompleto en algunos linfomas de células pequeñas como el LPL, el FL, el MZL, el MCL y la CLL. Por lo tanto, la diferenciación plasmocelular podría ser un fenómeno más frecuente de lo previamente estimado en estas entidades, de forma similar a los linfomas de células grandes. Este proceso podría influir en el diagnóstico, pronóstico y en las opciones terapéuticas para estos linfomas.

Aunque habitualmente el MCL no presenta rastros de diferenciación plasmocelular, se ha descrito que en el subgrupo indolente, caracterizado por ser SOX11-, se concentraban los casos con visible diferenciación plasmocelular, contrastando con el subgrupo convencional SOX11+, más agresivo. Se ha visto que SOX11 regula la expresión de PAX-5: en ausencia de SOX11 disminuyen los niveles de PAX-5 y se inicia una diferenciación plasmocelular temprana. La detección de SOX11 está siendo uno de los parámetros cruciales para el diagnóstico de estos pacientes, a pesar de que la elevada homología entre los genes *SOX11* y *SOX4* dificulta esta tarea en el diagnóstico de rutina.

En la CLL también se ha detectado cierto grado de diferenciación plasmocelular asociado a un aumento de BLIMP-1, el regulador principal de la diferenciación a célula plasmática. Se observó que esta diferenciación era parcial y que se desencadenaba en ausencia de represión de otros factores de transcripción asociados a células plasmáticas, como PAX-5. Sería particularmente interesante identificar el(los) mecanismo(s) por el(los) cual(es) las células de CLL presentan un bloqueo de la diferenciación plasmocelular y cuáles son las consecuencias clínicas de este fenómeno.

El objetivo general del proyecto es analizar el impacto de la diferenciación plasmocelular en la conducta biológica y la agresividad de los linfomas no-Hodgkin de células B pequeñas.

Los objetivos concretos del estudio I son:

- a. Determinar cuáles de los anticuerpos actuales detectan con mayor sensibilidad y especificidad a SOX11 en biopsias de NHLs.
- b. Utilizar los anticuerpos seleccionados para evaluar la presencia de SOX11 en diferentes linfomas de células B, además del MCL.

Los objetivos concretos del estudio II son:

- a. Analizar la diferenciación plasmocelular en muestras parafinadas de CLL, en base a marcadores fenotípicos (CD38, expresión de cadenas ligeras o pesadas) o transcripcionales (disminución de PAX-5 y aumento de IRF-4 y BLIMP-1).
- b. Determinar por western blot la expresión de las diferentes isoformas de BLIMP-1 en muestras congeladas de nódulos linfáticos y sangre periférica de CLL.
- c. Forzar la diferenciación plasmocelular en muestras primarias de pacientes con CLL y validar la diferenciación mediante el estudio fenotípico y transcripcional de las células resultantes.

## **RESULTADOS**





## ARTÍCULO I





## RESUMEN ARTÍCULO I

En el MCL, la sobreexpresión de ciclina D1 en ausencia de la t(11;14) dificulta el diagnóstico. En estos casos, la detección del factor de transcripción SOX11 representa un marcador de diagnóstico importante, ya que se expresa en la mayoría de MCLs, en particular en aquellos casos ciclina D1 negativos. Por lo tanto, un anticuerpo anti-SOX11 fiable es una herramienta esencial para el diagnóstico de rutina. En este estudio, hemos evaluado varios anticuerpos monoclonales anti-SOX11, y validado su adecuación mediante western blot e IHC en muestras parafinadas. Observamos que los resultados de expresión por IHC estaban relacionados con los niveles transcripcionales de *SOX11*, lo que sugiere que las modificaciones post-transcripcionales y post-traduccionales del gen no afectan significativamente la detección de SOX11 por IHC. Por otro lado, hemos probado estos anticuerpos en una amplia serie de tumores linfoides primarios, comparando con otros anticuerpos utilizados en la rutina. Concluimos que el anticuerpo monoclonal anti-SOX11<sup>143</sup>, a pesar de detectar también SOX4, es el más sensible en cuanto a detección de SOX11 por IHC, y que por lo tanto este anticuerpo representa la mejor opción para el diagnóstico de rutina.





## Assessment of SOX11 Expression in Routine Lymphoma Tissue Sections

### Characterization of New Monoclonal Antibodies for Diagnosis of Mantle Cell Lymphoma

Davide Soldini, MD,\* † Alexandra Valera, BSc,\* Carla Solé, BSc, ‡ Jara Palomero, BSc, ‡ Virginia Amador, PhD, ‡ José Ignacio Martín-Subero, PhD, ‡§ Inmaculada Ribera-Cortada, MD,\* Cristina Royo, PhD, ‡ Itziar Salaverria, PhD, ‡ Silvia Beà, PhD, ‡ Elena Gonzalvo, BSc,\* Henrik Johannesson, PhD, || Mileyka Herrera, MD,\* Lluís Colomo, MD,\* ‡§ Antonio Martínez, MD, PhD,\* ‡§ and Elias Campo, MD\* ‡§

**Abstract:** The diagnosis of mantle cell lymphoma (MCL) can be difficult, especially when no t(11;14) translocation and cyclin D1 overexpression can be detected. In such cases, the transcription factor *SOX11* represents an important diagnostic marker, as it is expressed in most MCLs and, in particular, in all cyclin D1-negative MCLs reported so far. A reliable anti-SOX11 antibody is therefore a very useful tool for routine diagnosis. Here, we characterize the new monoclonal anti-SOX11 antibodies, suitable for Western blot assay and immunohistochemistry (IHC) on formalin-fixed paraffin-embedded tissue; we tested them on a large series of primary lymphoid tumors and compared these results with those of other routinely used antibodies. Moreover, we show that IHC results depend on transcription levels of SOX11, which suggests that posttranscriptional and post-translational modifications do not significantly affect cutoff levels for IHC detection of SOX11.

**Key Words:** SOX11, mantle cell lymphoma, monoclonal antibody, qRT-PCR

(*Am J Surg Pathol* 2014;38:86–93)

Mantle cell lymphoma (MCL) is a B-cell neoplasm, which usually presents with advanced stage, rapid clinical progression, and a median survival of 3 to 5 years.<sup>1</sup> The distinction of MCL from other B-cell lymphomas, which might present with similar histologic features, such as chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma, follicular lymphoma, and marginal zone lymphoma, is therefore of major importance. In addition to clinical data and histomorphology, immunohistochemistry (IHC) and genetic analyses are required for a correct diagnosis. In particular, the detection of a t(11;14) translocation, which leads to the overexpression of cyclin D1, represents an indispensable diagnostic tool as it can be demonstrated in 90% of the MCLs.<sup>1–3</sup> Interestingly, MCLs lacking both a t(11;14) translocation and cyclin D1 expression but with a gene expression profile similar to that of cyclin D1-positive MCLs have been recognized.<sup>3</sup> Additional studies led to the discovery of SOX11, which is expressed in 78% to 100% of MCLs, including the cyclin D1-negative variant,<sup>4–7</sup> and appears to be the best discriminatory marker for the identification of a subgroup of MCL patients with clinical indolent behavior.<sup>8,9</sup> SOX11 represents, therefore, an important diagnostic and prognostic marker.

The *SOX11* gene, mapping at chromosome 2p25.3, encodes a transcription factor of 441 amino acids, which belongs to a family of approximately 20 genes characterized by the presence of a conserved DNA-binding high-mobility group domain. *SOX* genes are divided into 8 subgroups according to the degree of homology of the high-mobility group domain, and *SOX11*, together with *SOX4* and *SOX12*, belong to subgroup C.<sup>10</sup> *SOXC* genes are expressed during embryogenesis in neuronal progenitors and

From the \*Hematopathology Unit, Pathology Department, Hospital Clinic; †Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS); ‡Department of Anatomic Pathology, Pharmacology and Microbiology, University of Barcelona, Barcelona, Spain; †Institute of Surgical Pathology, University Hospital Zurich, Zurich, Switzerland; and ||Research and Development, Atlas Antibodies, Stockholm, Sweden.

D.S. and A.V. contributed equally.

**Conflicts of Interest and Source of Funding:** D.S. is supported by the Swiss National Science Foundation and by the Swiss Cancer League. A.M. and C.S. are supported by Fondo de Investigación Sanitaria, PI11/00907; "Red Temática de Investigación Cooperativa de Cáncer" (RTICC) RD12/0036/0004; and FEDER *One way to Europe*. E.C. is supported by the CICYT SAF 08/SAF 2008-03630 and Instituto de Salud Carlos III, RD12/0036/0023.

**Correspondence:** Antonio Martínez, MD, PhD, Department of Anatomic Pathology, Hospital Clinic, Villarroel 170, 080136-Barcelona, Spain (e-mail: antonmar@clinic.ub.es).

Supplemental Digital Content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's Website, www.ajsp.com.

Copyright © 2013 by Lippincott Williams & Wilkins

in mesenchymal cells of many organs. Moreover, *SOX11* and *SOX4* are expressed in medulloblastomas and malignant gliomas.<sup>11,12</sup> In hemato-lymphoid tissues, *SOX4* is the only member of the *SOX* family that has been shown to play a role in the physiological B-cell and T-cell development,<sup>13,14</sup> whereas its expression in hemato-lymphoid neoplasms is restricted to adult T-cell leukemia/lymphoma.<sup>15</sup>

So far, most IHC studies aiming at characterizing the expression of *SOX11* on formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues have been performed with polyclonal antibodies.<sup>4-7,16</sup> Despite their satisfactory diagnostic results in MCL, polyclonal anti-SOX11 antibodies have some limitations including certain unspecific reactions, such as cytoplasmic staining in normal tissues and in lymphomas lacking SOX11 mRNA expression,<sup>4,5</sup> as well as batch to batch variation in their reactivity, which represent major limiting factors. Recently, the monoclonal anti-SOX11 antibodies have been presented; however, their capacity to discriminate against SOX4 has not been tested.<sup>17</sup> Moreover, no study has compared IHC results with transcriptional activity for *SOX11*, so far. The aim of this study was to investigate the possible relationship existing between mRNA levels and IHC detection for SOX11, to compare the properties of the most commonly used anti-SOX11 antibodies on IHC and Western blot, and to characterize the new mouse monoclonal antibodies and to define its potential diagnostic value for MCL.

## MATERIALS AND METHODS

### Patient Samples

A large series of 209 primary lymphoid tumors diagnosed according to the last World Health Organization 2008 classification<sup>1</sup> was selected for the study. The diagnoses of these cases are summarized in Table 1. Samples were obtained from the tumor bank of the Department of Pathology, Hospital Clinic, University of Barcelona. The study was approved by the Ethic Committee of the Hospital Clinic of Barcelona.

### IHC and Fluorescence In Situ Hybridization Analysis

Tissue microarray sections were prepared from FFPE material derived from 153 of 209 cases selected for the study; the 57 remaining cases were examined on whole-tissue sections. Besides cyclin D1 (clone EP12; Thermo Fisher Scientific, Runcorn, UK), all cases were stained for SOX11 by means of the new mouse monoclonal anti-SOX11 antibodies anti-SOX11<sup>MRQ-58</sup> (Cell Marque, Rocklin, CA) and anti-SOX11<sup>143</sup> (AMAb90502, clone CL0143; Atlas Antibodies, Stockholm, Sweden), the latter being raised against the same peptide as is the mouse monoclonal anti-SOX11<sup>142</sup> (AMAb90501, clone CL0142; Atlas Antibodies).<sup>4,6</sup> A goat polyclonal anti-SOX11<sup>sc-17347</sup> (C-20, sc-17347; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA), raised against a peptide mapping near the C-terminus,<sup>18</sup> was also used. For comparison purposes, 59 cases stained with the rabbit polyclonal anti-SOX11<sup>HPA000536</sup> (HPA000536; Atlas Antibodies) in a previous study<sup>4</sup> were also included. Specific conditions of

use for each antibody are provided in Table 1, Supplemental Digital Content 1 (<http://links.lww.com/PAS/A183>).

An interphase fluorescence in situ hybridization analysis for the t(11;14) translocation using a dual-color dual-fusion probe (Vysis; Abbott Molecular, Abbot Park, IL) was performed for all 9 cyclin D1-negative MCL cases, as previously described.<sup>19</sup>

### Cell Lines and Western Blot Analysis

Protein extract preparations were obtained from the MCL cell line JVM2, which has been previously shown to lack SOX11 expression,<sup>20</sup> as well as from the nonlymphoid HEK293 cell line and 2 HEK293 cell lines stably transfected with vectors encoding human influenza hemagglutinin (HA)-tagged SOX4-HA (HEK293-SOX4-HA) and SOX11-HA proteins (HEK293-SOX11-HA), respectively.<sup>20,21</sup> The expression plasmids pcDNA<sub>3</sub>-SOX11-HA and pcDNA<sub>3</sub>-SOX4-HA were generated as previously described.<sup>20</sup> For Western blot analysis, 50 µg total protein extract from JVM2, 50 µg from HEK293, and 5 µg from both HEK293-SOX11-HA and HEK293-SOX4-HA were used. Four different anti-SOX11 antibodies were applied: anti-SOX11<sup>143</sup>, anti-SOX11<sup>142</sup>, anti-SOX11<sup>MRQ-58</sup>, and anti-SOX11<sup>sc-17347</sup>. A mouse monoclonal anti-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase antibody (A-3; Santa Cruz Biotechnology Inc.) served as loading control. Membranes were developed with Pierce ECL Western blot substrate (Thermo Scientific Inc., Erembodegem, Belgium) and visualized on a LAS4000 device (Fujifilm, Düsseldorf, Germany). Protein quantification was done with Image Gauge software (Fujifilm).

### SOX11 Expression by Microarray and Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

*SOX11* mRNA expression was investigated by quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR) in 23 cyclin D1-positive MCL cases and in 2 diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) cases, as previously described.<sup>8,20</sup> Briefly, total mRNA was extracted from frozen tissue samples or FFPE tissue blocks, and potential residual DNA was removed using the TURBO DNA-free kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). The cDNA synthesis was carried out from 500 to 800 ng total mRNA, and the product was amplified and quantified using TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), TaqManMGB Probes, and primers designed using Primer Express Version 2.0: *SOX11* (probe 5'-TTTTAACCACG GATAATTG-3'; forward primer 5'-CATGTAGACTAA TGCAGCCATTGG-3'; reverse primer 5'-CACGGAG CACGTGTCAATTG-3'). The cDNA was analyzed using duplicates in an ABI Prism 7900HT Fast Sequence Detection System (Applied Biosystems). Relative quantification of gene expression was performed with the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method using human  $\beta$ -glucuronidase as the endogenous control and Universal Human Reference RNA (Stratagene; Agilent Technologies, Santa Clara, CA) as the mathematical calibrator.

**TABLE 1. IHC SOX11 Expression in a Series of Cyclin D1-positive or Cyclin D1-negative Lymphomas, Using the Mouse Monoclonal anti-SOX11<sup>MRQ-58</sup>, Anti-SOX11<sup>143</sup>, and the Goat Polyclonal Anti-SOX11<sup>sc-17347</sup> Antibody**

CCND1	Diagnosis	Mouse Monoclonal Anti-SOX11 <sup>MRQ-58</sup> SOX11 Positive/Total Cases (%) (n = 205)	Mouse Monoclonal Anti-SOX11 <sup>143</sup> SOX11 Positive/Total Cases (%) (n = 209)	Goat Polyclonal Anti-SOX11 <sup>sc-17347</sup> SOX11 Positive/Total Cases (%) (n = 177)
Negative	B-LBL	0/4	2/4 (50)	0/4
	T-LBL	0/4	4/4 (100)	1/3 (33)
	CLL	0/9	0/9	0/9
	HCL	0/3	0/3	1/3 (33)
	PCM/Plasmacytoma	0/4	0/4	0/3
	MZL	0/10	0/10	0/10
	FL	0/8	0/8	0/1
	MCL	9/9 (100)	9/9 (100)	9/9 (100)
	DLBCL	0/43	2/43 (5)	1/35 (3)
	PBL	0/9	0/9	0/7
	PEL	0/2	0/2	0/2
	BL	0/32	22/32 (69)	6/32 (19)
	BCLU	0/5	0/5	1/4 (25)
	T-PLL	0/2	1/2 (50)	0/2
	Extranodal NK/T-cell lymphoma	0/1	0/1	0/1
	EATL II	0/1	0/1	0/1
	HSTL	0/3	0/3	0/3
	PTCL, NOS	0/11	0/11	0/10
	AITL	0/6	0/6	0/4
	ALCL ALK <sup>+</sup>	0/3	0/3	0/3
	ALCL ALK <sup>-</sup>	0/1	0/1	0/1
	NLPHL	0/1	0/1	—
	cHL	0/5	0/5	0/1
Positive	HCL	0/2	0/2	0/2
	PCM/Plasmacytoma	0/4	0/4	0/4
	MCL	20/23 (87)	20/27 (74)	18/23 (78)

AITL indicates angioimmunoblastic T-cell lymphoma; ALCL, anaplastic large cell lymphoma; BCLU, B-cell lymphoma unclassified with features intermediate between DLBCL and BL; B-LBL, B-lymphoblastic lymphoma; cHL, classical Hodgkin lymphoma; CLL, chronic lymphocytic leukemia; EATL II, enteropathy-associated T-cell lymphoma type II; FL, follicular lymphoma; HSTL, hepatosplenic T-cell lymphoma; MZL, marginal zone lymphoma; NLPHL, nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma; PBL, plasmablastic lymphoma; PCM, plasma cell myeloma; PEL, primary effusion lymphoma; PTCL NOS, peripheral T-cell lymphoma not otherwise specified; T-LBL, T-lymphoblastic lymphoma; T-PLL, T-cell prolymphocytic leukemia.

**RESULTS**

**Characterization of Monoclonal SOX11 Antibodies in a Western Blot Assay**

All monoclonal anti-SOX11 antibodies were initially tested in a Western blot assay, together with the previously described polyclonal anti-SOX11<sup>sc-17347</sup>.<sup>18</sup> For this purpose, protein extracts of the MCL cell line JVM2, which does not express SOX11, and of the nonlymphoid HEK293, HEK293-SOX4-HA, and HEK293-SOX11-HA cell lines were used. Polyclonal anti-SOX11<sup>sc-17347</sup> allowed the detection of a specific band on the protein extract of the HEK293-SOX11-HA and no band on the other cell lines. Anti-SOX11<sup>143</sup> highlighted a strong band for HEK293-SOX11-HA and a weak band of the same size in the HEK293-SOX4-HA cell line corresponding to SOX4, whereas no band was detected for the nontransfected HEK293 (not shown) and JVM2 cell lines. Similar results were obtained with anti-SOX11<sup>142</sup> (Fig. 1). The anti-SOX11<sup>MRQ-58</sup> only highlighted the band corresponding to SOX11 for HEK293-SOX11-HA. These data suggest although anti-SOX11<sup>142</sup> and anti-SOX11<sup>143</sup> antibodies recognized overexpressed SOX4, even though to a lesser extent, the anti-SOX11<sup>sc-17347</sup> and anti-SOX11<sup>MRQ-58</sup> did not cross-react with SOX4.

Then, we compared the SOX11/SOX4 signal intensity ratios for anti-SOX11<sup>143</sup> and anti-SOX11<sup>142</sup>, which were 14.2 and 3.5, respectively, indicating 4.0 times higher specificity for anti-SOX11<sup>143</sup>. Finally, the intensity ratios for the signals of SOX11, which were normalized over the loading control glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, indicated that anti-SOX11<sup>143</sup> is more sensitive than anti-SOX11<sup>142</sup> and anti-SOX11<sup>sc-17347</sup> (signal intensity ratios for SOX11 anti-SOX11<sup>143</sup>/anti-SOX11<sup>142</sup> was 8.1 and anti-SOX11<sup>143</sup>/anti-SOX11<sup>sc-17347</sup> was 12.4).

**IHC Detection of SOX11 Correlates With mRNA Levels in MCL**

The study of the protein detection on FFPE tissue and the comparison with mRNA levels of SOX11 was performed by both qRT-PCR and IHC in 23 cyclin D1-positive MCL. For IHC staining, anti-SOX11<sup>143</sup>, anti-SOX11<sup>142</sup>, anti-SOX11<sup>sc-17347</sup>, and anti-SOX11<sup>MRQ-58</sup> were used.

In positive cases, nuclear staining with at least weak intensity was detected in most cells, whereas negative cases presented with complete absent nuclear staining. Results of the IHC and mRNA levels of *SOX11* are shown in Table 2. Briefly, qRT-PCR values for SOX11

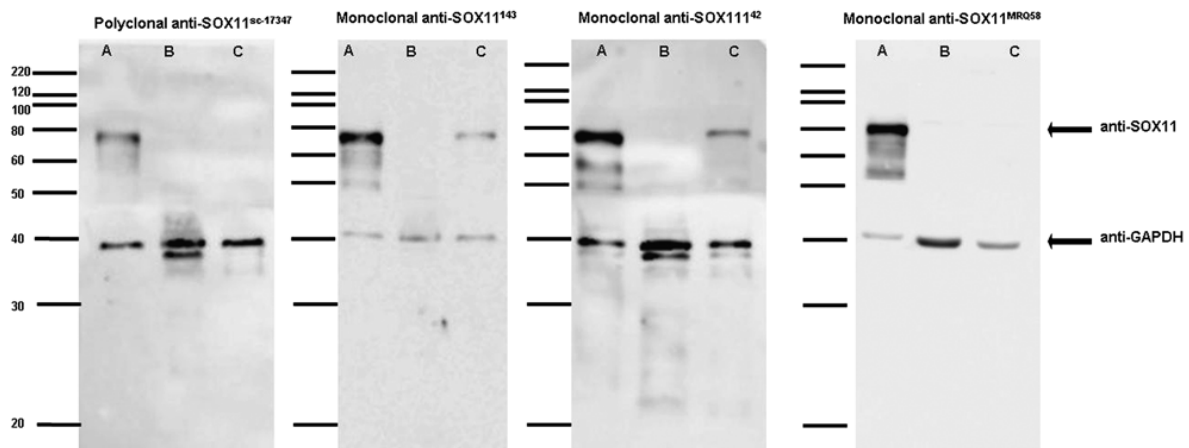


FIGURE 1. Western blot–based evaluation of anti-SOX11 antibodies. Western blot was performed on protein extracts derived from HEK293-SOX11-HA (A), JVM2 (B), and HEK293-SOX4-HA cell lines (C). Polyclonal anti-SOX11<sup>sc-17347</sup> antibody merely revealed a specific band at 60 to 80 kDa for the HEK293-SOX11-HA cell line. Monoclonal anti-SOX11<sup>143</sup> and anti-SOX11<sup>142</sup> antibodies highlighted a band of the same size for HEK293-SOX11-HA and a weaker one for HEK293-SOX4-HA, which was not detected with anti-SOX11<sup>MRQ-58</sup>. Anti-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase antibody was used as a loading control.

ranged from 0.03 to 90.30. For all 4 antibodies, IHC for SOX11 resulted negative in cases with qRT-PCR values  $\leq 1.21$  and positive for values  $\geq 9.57$ . Some discordance in the immunostaining with the 4 antibodies was instead observed in 2 cases with intermediate mRNA levels lying between 1.21 and 9.57 (3.53 and 3.88, respectively) (Table 2).

**Cyclin D1 and SOX11 Protein Expression in MCL and Other Lymphomas**

We analyzed a series of FFPE tissues from different lymphoma subtypes and reactive lymphoid tissues to evaluate the possible use of these antibodies in routine diagnosis. Included were 9 immunophenotypically and genetically characterized cases of cyclin D1-negative MCL, which all lacked cyclin D1 expression by IHC and a t(11;14) translocation by fluorescence in situ hybridization analysis.

All positive cases exhibited distinct nuclear staining with monoclonal anti-SOX11<sup>143</sup> and anti-SOX11<sup>MRQ-58</sup>, and a more heterogenous expression was observed with polyclonal anti-SOX11<sup>sc-17347</sup>. Results are summarized in Table 1.

Briefly, all 9 cyclin D1-negative MCLs were positive with both monoclonal antibodies. Among cyclin D1-positive MCL cases, 20/27 (74%) were positive with anti-SOX11<sup>143</sup> (Fig. 2) and 20/23 (84%) with anti-SOX11<sup>MRQ-58</sup>, although with weaker staining (Table 2). None of the non-MCL cases was positive using the anti-SOX<sup>MRQ-58</sup>. Nevertheless, SOX11 expression was observed in 31/173 (18%) non-MCL cases using anti-SOX11<sup>143</sup> and in 10/145 (7%) non-MCL cases using anti-SOX11<sup>sc-17347</sup>. Two DLBCL cases were positive with anti-SOX11<sup>143</sup> (Fig. 3), and one of them was also positive with anti-SOX11<sup>sc-17347</sup>, although with weaker expression levels. None of these 2 cases has SOX11 mRNA expression by qRT-PCR. Moreover, we observed a weak nuclear staining in follicular dendritic cells (FDC) and in the

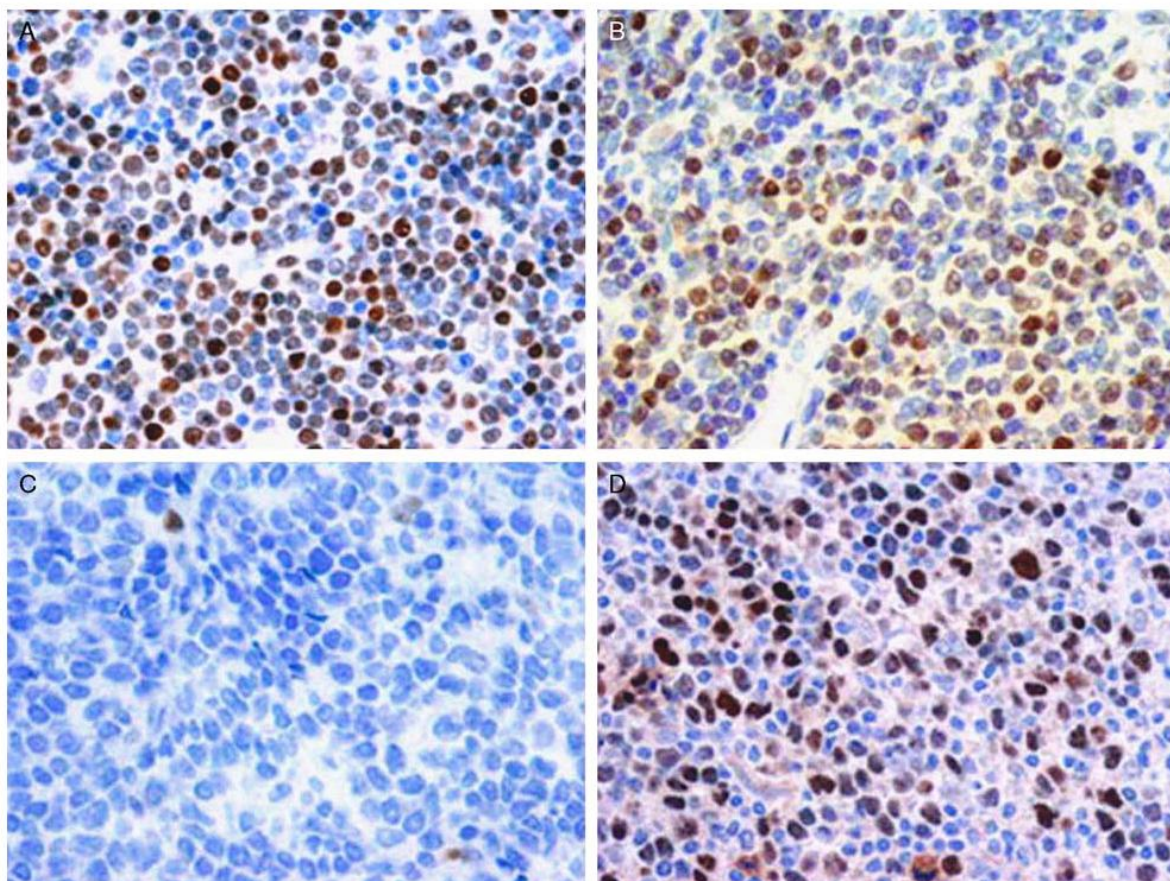
cells of high endothelial venules with the anti-SOX11<sup>143</sup>, most evident in angioimmunoblastic T-cell lymphoma.

Among the 59 previously published cases stained with the polyclonal anti-SOX11<sup>HPA000536,4</sup>, we identified 4 discordant cases (7%). All these cases were Burkitt lymphoma (BL). Three previously reported negative cases turned to be positive with anti-SOX11<sup>143</sup>, and one of

TABLE 2. Protein and mRNA Levels of SOX11 Expression by IHC and qRT-PCR on a Series of Cyclin D1-positive MCL

Case	SOX11 <sup>143</sup>	SOX11 <sup>142</sup>	SOX11 <sup>MRQ58</sup>	SOX11 <sup>sc-17347</sup>	qRT-PCR
1	–	–	–	–	0.03
2	–	–	–	–	0.79
3	–	–	–	–	1.21
4	+	–	+	+	3.53
5	–	+	–	–	3.88
6	+	+	+	+	9.57
7	+	+	+	+	9.97
8	+	+	+	+	13.21
9	+	+	+	+	13.32
10	+	+	+	+	14.87
11	+	+	+	NP	18.36
12	+	+	+	+	19.56
13	+	+	+	+	21.03
14	+	+	+	+	23.80
15	+	+	+	+	24.32
16	+	+	+	+	28.69
17	+	+	+	+	30.33
18	+	+	+	+	30.53
19	+	+	+	+	34.06
20	+	+	+	+	35.61
21	+	+	+	+	36.14
22	+	+	+	+	38.40
23	+	+	+	+	90.30

Cases with qRT-PCR values  $\leq 1.21$  resulted as negative on IHC for SOX11, whereas cases resulted as SOX11 positive for qRT-PCR values  $\geq 9.57$ . qRT-PCR was performed in all cases on frozen material. NP indicates not performed.



**FIGURE 2.** IHC analysis on cyclin D1-positive and cyclin D1-negative MCL. Detection of nuclear SOX11 expression in cyclin D1-negative (A and C) and in cyclin D1-positive cases (B and D). A and B, SOX11 staining using monoclonal anti-SOX11<sup>143</sup>. C and D, cyclin D1 staining.

them was also positive with anti-SOX11<sup>sc-17347</sup>. One previously reported positive BL did not show expression with anti-SOX11<sup>sc-17347</sup>. None of the discordant cases showed expression with anti-SOX11<sup>MRQ-58</sup>.

### DISCUSSION

Here, we present the new mouse monoclonal anti-SOX11 antibodies, which show very good performance on FFPE tissue samples and are therefore suitable for routine diagnostic testing. *SOX11* represents an important diagnostic marker in MCL, as the presence of high levels of SOX11 mRNA and the protein in a nuclear localization are reported in most MCL cases, independent of their cyclin D1 status.<sup>4,16</sup> However, no study on the comparison between IHC detection of anti-SOX11 antibodies with SOX11 mRNA levels has been conducted so far. This might represent an important issue, as posttranscriptional regulation and posttranslational modifications can lead to changes in protein levels, and in routine diagnostic testing SOX11 is usually detected at the protein level by means of IHC. SOX proteins may be

modified by ubiquitin and small ubiquitin-like modifier, which can affect their stability and subcellular localization.<sup>22,23</sup> On a series of 23 cyclin D1-positive MCL cases, we could show that both anti-SOX11<sup>143</sup> and anti-SOX11<sup>MRQ-58</sup> can detect SOX11 protein in all cases with qRT-PCR values >9.57. A similar correlation was obtained with 2 other antibodies, that is, anti-SOX11<sup>HPA000536</sup> and anti-SOX11<sup>142</sup>, and minor differences were merely observed in 2 cases presenting with almost identical qRT-PCR values lying close to the IHC detection level. This suggests that changes in posttranscriptional and posttranslational modifications have a minor impact on the SOX11 cutoff value for protein detection on IHC.

The properties of anti-SOX11 antibodies were further studied on Western blot on extracts of cells overexpressing SOX11, as well as SOX4, as this represents the protein with highest homology belonging to the same subgroup, and were compared with those of anti-SOX11<sup>142</sup> and anti-SOX11<sup>sc-17347</sup>. Anti-SOX11<sup>143</sup> recognized SOX11 and, to a far lesser extent, SOX4 similarly to anti-SOX11<sup>142</sup>, which was raised against the same peptide of SOX11. However, the specificity and sensitivity of anti-SOX11<sup>143</sup> for SOX11

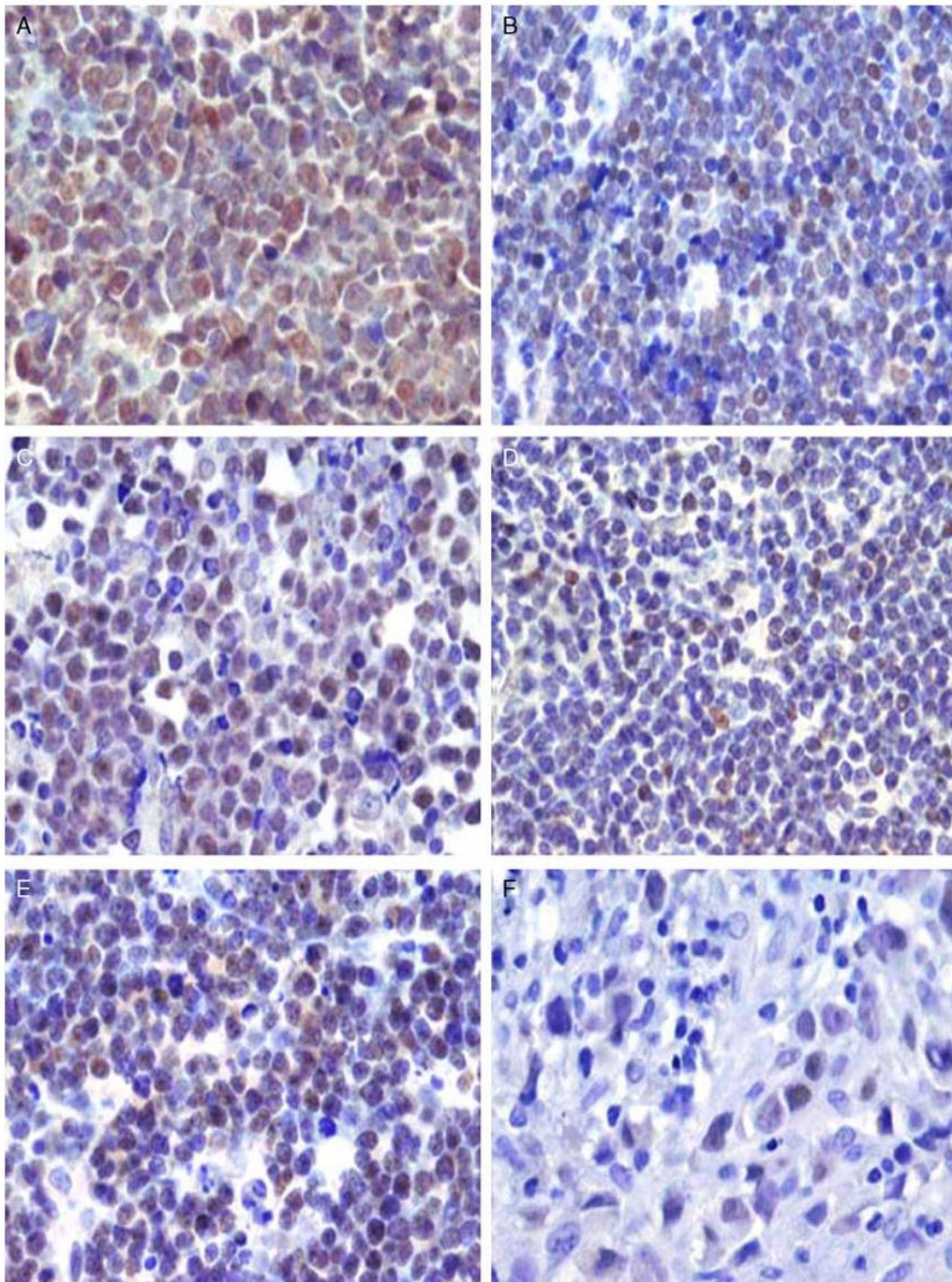


FIGURE 3. IHC results of SOX11 expression in lymphomas other than MCL using monoclonal anti-SOX11<sup>143</sup> antibody. Nuclear SOX11 expression in B-lymphoblastic lymphoma (A), T-lymphoblastic lymphoma (B), BL (C), T-cell prolymphocytic leukemia (D), DLBCL (E), and anaplastic large cell lymphoma, ALK negative (F).

were 4.0 and 8.1 times higher, respectively, when compared with the anti-SOX11<sup>142</sup> antibody. Anti-SOX11<sup>sc-17347</sup>, which on Western blot assay gives very specific results, is 12.4 times less sensitive than anti-SOX11<sup>143</sup> antibody. The

anti-SOX11<sup>MRQ-58</sup> did not showed cross-reactivity with SOX4.

In our series of 209 primary lymphoid tumors, immunostaining with anti-SOX11<sup>143</sup> gave results that are

TABLE 3. SOX11 IHC Expression Lymphomas in Previous Studies

Diagnosis	n (%)						
	SOX11 N-Term Dictor et al <sup>6</sup>	SOX11 C-Term Ek et al <sup>5</sup>	Monoclonal SOX11-C1 Nordström et al <sup>17</sup>	Polyclonal Sigma/Atlas Zeng et al <sup>16</sup>	Polyclonal Atlas Mozos et al <sup>4</sup>	Polyclonal Atlas Chen et al <sup>7</sup>	Polyclonal Atlas Ek et al <sup>5</sup>
B-LBL	8/9 (89)	3/5 (60)	0/2	4/5* (80)	1/1 (100)		
T-LBL	10/10 (100)	4/5 (80)	0/4		5/5 (100)		
CLL	0/6		0/14	0/5	0/12	0/50	0/47
HCL	6/12 (50)	2/3 (67)	0/7			5/10 (50)	
LPL	0/1			0/5			
PCM	0/9	0/1			0/2	0/30	
MZL	0/16			0/5	0/20	0/12	
FL	0/4		0/15	0/10	0/22	0/22	0/47
MCL CCND1 <sup>+</sup>	18/23 (78)		15/16 (94)	30/30 (100)	50/54 (93)	54/57 (95)	26/28 (93)
MCL CCND1 <sup>-</sup>				5/5 (100)	12/12 (100)		1/1 (100)
DLBCL	0/31			0/75	0/63	0/30	2/30 (7)
BL	7/14 (50)	3/4 (75)	2/4 (50)	1/5 (20)	2/8 (25)		
BCLU	0/6						
T-PLL					2/3 (67)		
T-LGL	0/1						
Extranodal							
NK/T-cell	0/4				0/3		
EATL	0/2						
HSTL	0/1				0/3		
MF	0/1						
PTCL, NOS	0/4				0/15		
AITL	0/3				0/5		
ALCL ALK <sup>+</sup>	0/4				0/3		
ALCL ALK <sup>-</sup>					0/3		
NLPHL	0/2				0/5		
cHL	0/5				1/36 (3)		

\*These cases included B-LBL and T-LBL without distinction.

AITL indicates angioimmunoblastic T-cell lymphoma; ALCL, anaplastic large cell lymphoma; BCLU, B-cell lymphoma unclassified with features intermediate between DLBCL and BL; B-LBL, B-lymphoblastic lymphoma; cHL, classical Hodgkin lymphoma; CLL, chronic lymphocytic leukemia; EATL, enteropathy-associated T-cell lymphoma; FL, follicular lymphoma; HSTL, hepatosplenic T-cell lymphoma; LPL, lymphoplasmacytic lymphoma; MF, mycosis fungoide; MZL, marginal zone lymphoma; NLPHL, nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma; PCM, plasma cell myeloma; PTCL NOS, peripheral T-cell lymphoma not otherwise specified; T-LBL, T-lymphoblastic lymphoma; T-LGL, T-cell large granular lymphoma; T-PLL, T-cell prolymphocytic leukemia.

mostly consistent with those previously reported (Table 3).<sup>4-7,16</sup> A fraction of the 209 lymphomas presented herein was included in a previous study that used polyclonal anti-SOX11<sup>HPA000536</sup> and showed highly concordant results.<sup>4</sup> Most cases of this same series were additionally stained with the polyclonal anti-SOX11<sup>sc-17347</sup>, and results were similar, apart from a higher number of negative cases with anti-SOX11<sup>sc-17347</sup>, which might be explained by its lower sensitivity on Western blot. Two of 43 DLBCL cases in our series showed weak nuclear SOX11 expression, similarly to that reported in a previous study.<sup>5,24</sup> qRT-PCR of these 2 cases was performed, which resulted in the absence of SOX11 transcript. These cases were also negative for cyclin D1. The absence of these 2 markers excludes a pleomorphic variant of MCL. These data, together with the cross-reactivity of the antibody observed on Western blot assay for SOX4, suggest that in rare cases weak nuclear positivity might be due to the high homology of the 2 proteins.<sup>25</sup> Analysis of data derived from previously published gene expression profile studies showed that some DLBCLs may express SOX4 but are negative for SOX11.<sup>26</sup> The nuclear staining observed in FDC and endothelial cells of angioimmunoblastic T-cell

lymphoma with monoclonal anti-SOX11<sup>143</sup> might also be due to a cross-reaction with SOX4; however, the same positivity was observed with the anti-SOX11<sup>sc-17347</sup>, which does not recognize SOX4 on Western blot. This suggests that SOX11 could be expressed in these 2 cell populations. In this regard, SOX11 expression has been reported in FDC neoplasms<sup>27</sup> as well as in endothelial cells and FDC of MCL in situ.<sup>28</sup> To clarify this issue, additional studies are needed, which might reveal a potential role of SOX11 as a marker for these 2 cell populations and for tumors deriving from them. Importantly, the good performance of the monoclonal anti-SOX11<sup>143</sup> and anti-SOX11<sup>MRQ-58</sup> on FFPE tissue samples is further supported by the fact that none of the cases of our series presented with unspecific cytoplasmic staining, in contrast with previous observations with polyclonal antibodies.<sup>4,5</sup>

Some studies have reported SOX11 expression in cyclin D1-positive hairy cell leukemia (HCL),<sup>6,7</sup> which, together with data on transcription of SOX11 and cyclin D1 in B-cell lymphomas,<sup>29</sup> suggested a possible dependence between SOX11 and cyclin D1 expression. In our series, however, all 5 HCL cases (3 of them being cyclin D1 positive and 2 cyclin D1 negative) were negative for



anti-SOX11<sup>143</sup> and anti-SOX11<sup>MRQ-58</sup>, which is consistent with both the recently published results obtained with another monoclonal anti-SOX11<sup>17</sup> and data on the absence of SOX11 mRNA transcript in HCL.<sup>5</sup> Only 1 HCL case showed nuclear staining with anti-SOX11<sup>sc-17347</sup>; however, this was negative for cyclin D1. Similarly, SOX11 is absent in cyclin D1-positive plasma cell myelomas, some of which carry the same t(11;14) translocation as MCL.<sup>4,6,7,30</sup> In contrast, SOX11 is expressed in lymphomas without t(11;14), such as BL, T-lymphoblastic lymphoma, and B-lymphoblastic lymphoma.<sup>4,6,16,17</sup> These data suggest that the expressions of cyclin D1 and SOX11 are independent.

Apart from the translocations of the *CCND2* gene, few data are available on the pathogenesis of cyclin D1-negative MCL.<sup>31</sup> In this regard, SOX11 might play a role in the development of cyclin D1-negative MCL, as its expression was shown to be oncogenic promoting tumor growth in a mouse model and to block plasmacytic cell differentiation by forced induction of the direct target gene *PAX5*.<sup>14</sup> This might also explain the different behavior of SOX11-negative MCL, as these patients present more frequently with non-nodal leukemic disease and an indolent clinical course, even though contrasting results have been reported.<sup>8,9,18,32</sup>

In conclusion, our data support that SOX11 expression by IHC correlates well with its transcription level. Most importantly, we have assessed the performance of several SOX11 antibodies on FFPE tissue sections. At least, 2 monoclonal antibodies, anti-SOX11<sup>143</sup> and anti-SOX11<sup>MRQ-58</sup>, are useful in recognize MCL in routine diagnostic tissues. Although anti-SOX11<sup>MRQ-58</sup> seems to be more specific for SOX11 recognition in Western blot, anti-SOX11<sup>143</sup> may be more sensitive in IHC.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Ingrid Rubio and Montserrat Tortosa for their technical support during the development of the project and Jorge Martinalbo for comments on the manuscript.

REFERENCES

1. Swerdlow S, Campo E, Harris NL, et al. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon, France: IARC Press; 2008.
2. Yatabe Y, Suzuki R, Tobinai K, et al. Significance of cyclin D1 overexpression for the diagnosis of mantle cell lymphoma: a clinicopathologic comparison of cyclin D1-positive MCL and cyclin D1-negative MCL-like B-cell lymphoma. *Blood*. 2000;95:2253–2261.
3. 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.
4. Mozas 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.
5. 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.
6. 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.
7. Chen YH, Gao J, Fan G, et al. 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;23:105–112.

8. Royo C, Navarro A, Clot G, et al. Non-nodal type of mantle cell lymphoma is a specific biological and clinical subgroup of the disease. *Leukemia*. 2012;26:1895–1898.
9. 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.
10. Kiefer JC. Back to basics: Sox genes. *Dev Dyn*. 2007;236:2356–2366.
11. Weigle B, Ebner R, Temme A, et al. Highly specific overexpression of the transcription factor SOX11 in human malignant gliomas. *Oncol Rep*. 2005;13:139–144.
12. Lee CJ, Appleby VJ, Orme AT, et al. Differential expression of SOX4 and SOX11 in medulloblastoma. *J Neurooncol*. 2002;57:201–214.
13. van de WM, Oosterwegel M, van NK, et al. Sox-4, an Sry-like HMG box protein, is a transcriptional activator in lymphocytes. *EMBO J*. 1993;12:3847–3854.
14. Schilham MW, Oosterwegel MA, Moerer P, et al. Defects in cardiac outflow tract formation and pro-B-lymphocyte expansion in mice lacking Sox-4. *Nature*. 1996;380:711–714.
15. Higuchi T, Nakayama T, Arao T, et al. SOX4 is a direct target gene of FRA-2 and induces expression of HDAC8 in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood*. 2013;121:3640–3649.
16. Zeng W, Fu K, Quintanilla-Fend L, et al. Cyclin D1-negative blastoid mantle cell lymphoma identified by SOX11 expression. *Am J Surg Pathol*. 2012;36:214–219.
17. Nordström L, Andreasson U, Jerkeman M, et al. Expanded clinical and experimental use of SOX11 - using a monoclonal antibody. *BMC Cancer*. 2012;12:269.
18. Vegliante MC, Palomero J, Perez-Galan P, et al. SOX11 regulates PAX5 expression and blocks terminal B-cell differentiation in aggressive mantle cell lymphoma. *Blood*. 2013;121:2175–2185.
19. Valera A, Balague O, Colomo L, et al. IG/MYC rearrangements are the main cytogenetic alteration in plasmablastic lymphomas. *Am J Surg Pathol*. 2010;34:1686–1694.
20. Vegliante MC, Royo C, Palomero J, et al. Epigenetic activation of SOX11 in lymphoid neoplasms by histone modifications. *PLoS One*. 2011;6:e21382.
21. Amador V, Ge S, Santamaria PG, et al. APC/C(Cdc20) controls the ubiquitin-mediated degradation of p21 in prometaphase. *Mol Cell*. 2007;27:462–473.
22. Pan X, Li H, Zhang P, et al. Ubc9 interacts with SOX4 and represses its transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;344:727–734.
23. Gill G. SUMO changes Sox for developmental diversity. *Mol Cell*. 2005;20:495–496.
24. Hsiao SC, Cortada IR, Colomo L, et al. SOX11 is useful in differentiating cyclin D1-positive diffuse large B-cell lymphoma from mantle cell lymphoma. *Histopathology*. 2012;29:685–693.
25. Dy P, Penzo-Mendez A, Wang H, et al. The three SoxC proteins—Sox4, Sox11 and Sox12—exhibit overlapping expression patterns and molecular properties. *Nucleic Acids Res*. 2008;36:3101–3117.
26. Hummel M, Bentink S, Berger H, et al. A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling. *N Engl J Med*. 2006;354:2419–2430.
27. Huppman AR, Leung AA, Jaffe ES, et al. SOX11 is a marker of follicular dendritic cell neoplasms. *Mod Pathol*. 2011;24:302A.
28. Carvajal-Cuenca A, Sua LF, Silva NM, et al. In situ mantle cell lymphoma: clinical implications of an incidental finding with indolent clinical behavior. *Haematologica*. 2012;97:270–278.
29. Cao X, Fan L, Fang C, et al. The expression of SOX11, cyclin D1, cyclin D2, and cyclin D3 in B-cell lymphocytic proliferative diseases. *Med Oncol*. 2012;29:1190–1196.
30. Troussard X, vet-Loiseau H, Macro M, et al. Cyclin D1 expression in patients with multiple myeloma. *Hematol J*. 2000;1:181–185.
31. Salaverria I, Royo C, Carvajal-Cuenca A, et al. *CCND2* rearrangements are the most frequent genetic events in Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma. *Blood*. 2012;121:1394–1402.
32. 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.

## ARTÍCULO II





## RESUMEN ARTÍCULO II




La diferenciación a célula plasmática y la transformación a células secretoras de anticuerpos son dos procesos que pueden desregularse en las neoplasias linfoides. Esta diferenciación se asocia frecuentemente a la sobreexpresión del represor transcripcional BLIMP-1 en los linfomas B de bajo grado. En la CLL, la relevancia de este fenómeno sigue siendo parcialmente incierta. En este estudio, utilizando un grupo de 137 biopsias de CLL extramedulares, se pone de manifiesto una discordancia entre los niveles proteicos de BLIMP-1 y los marcadores clásicos de la diferenciación plasmocelular. En las muestras de pacientes por western blot, se muestra la expresión de una isoforma truncada de la proteína, BLIMP-1 $\Delta$ 6, sin descripción previa en la CLL. Mediante la diferenciación *in vitro* de células primarias de CLL, vemos que el proceso es incompleto, con unos cambios morfológicos, un aumento de CD38, de IRF-4 y de la isoforma activa BLIMP-1 $\alpha$  compatibles con diferenciación plasmocelular, pero manteniéndose los niveles de BLIMP-1 $\Delta$ 6, PAX-5 y CD19. Por lo tanto, la expresión de la isoforma BLIMP-1 $\Delta$ 6 en la CLL podría estar implicada en un defecto de la diferenciación final a célula plasmática y en un silenciamiento incompleto de la identidad de las células B.

Anotación: Siendo este trabajo publicado como carta al editor, no consta del apartado de material y métodos, por ello, estos se encuentran en el Anexo I.





## Expression of a truncated B lymphocyte-induced maturation protein-1 isoform is associated with an incomplete plasmacytic differentiation program in chronic lymphocytic leukemia

Carla Solé<sup>a</sup>, Daniel Martínez<sup>b</sup>, Eva Giné<sup>c</sup>, Blanca Gonzalez-Farre<sup>b</sup>, Patricia Pérez-Galán<sup>a</sup>, Giovanna Roncador<sup>d</sup>, Elías Campo<sup>a,b</sup> , Estela Matutes<sup>c</sup>, Armando López-Guillermo<sup>c</sup>, Gaël Roué<sup>a\*</sup>  and Antonio Martínez<sup>a,b\*</sup> 

<sup>a</sup>Division of Hematology and Oncology, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Barcelona, Spain; <sup>b</sup>Hematopathology Unit, Department of Pathology, Hospital Clinic, Barcelona, Spain; <sup>c</sup>Department of Hematology, Hospital Clinic, Barcelona, Spain; <sup>d</sup>Spanish National Cancer Research Centre, Madrid, Spain

**ARTICLE HISTORY** Received 16 February 2017; revised 24 April 2017; accepted 1 May 2017





Plasmacytic cell differentiation is a common type of maturation in low grade B-cell lymphomas, such as follicular lymphoma (FL), mantle cell lymphoma (MCL) and chronic lymphocytic leukemia (CLL). Depending on the lymphoma subtype, this phenomenon can be associated with resistance to proteasome inhibition [1] or plasmablastic transformation [2]. The differentiation of B-cells into immunoglobulin secreting plasma cells is controlled by B lymphocyte-induced maturation protein-1 (BLIMP-1/PRDM1), a key repressor of transcription factors involved in mature B cell identity, such as PAX5 and BCL6 [3]. Human *PRDM1* gene can generate three different isoforms of BLIMP-1 protein, namely BLIMP-1 $\alpha$ , BLIMP-1 $\beta$  and the recently described BLIMP-1 $\Delta$ 6. While full-length BLIMP-1 $\alpha$  is the active form, BLIMP-1 $\beta$  lacks functional regulatory domain and is able to inhibit BLIMP-1 $\alpha$  activity [4]. BLIMP-1 $\Delta$ 6 is originated by alternative splicing and is predicted to form nonfunctional heterodimers with BLIMP-1 $\alpha$  [5]. BLIMP-1 protein is expressed in plasma-cell derived neoplasms, as well as in aggressive B-cell lymphomas. In CLL, although the protein is present at detectable levels, ultimate maturation into antibody-producing plasma cells seems to be blocked [6]. To evaluate a possible role for the expression of BLIMP-1 protein isoforms in the phenomenon of plasmacytic differentiation, we analyzed its expression using a previously described pan-isoform antibody [7], in extramedullary tissue biopsies from 137 patients diagnosed with CLL according to the WHO classification (Table 1). The biopsies analyzed consisted in lymph node for 116 cases (85%), spleen for three cases (2%) and extranodal tissues for the remaining 18 cases (13%). BLIMP-1 expression was observed in 43/137 (31%) CLL histological sections, both in large cells


inside proliferation centers as well as in the small lymphocytic component, as shown in Figure 1(A) in five representative cases. In 18/43 cases, the positivity appeared to be even stronger than in the multiple myeloma (MM) cell line U266 and the diffuse large B cell

**Table 1.** Main features of CLL patients at biopsy.

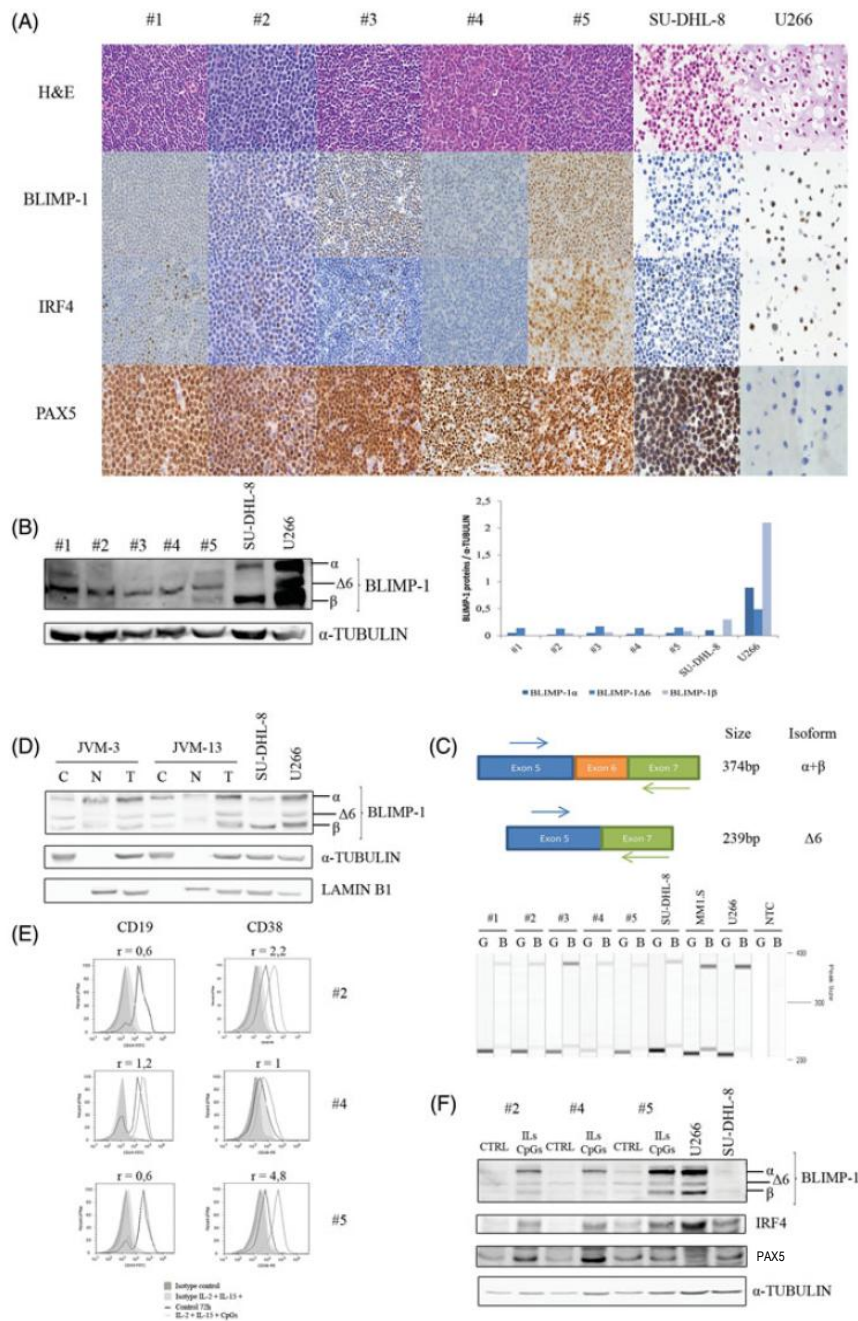
Parameters no.	All (N = 137)
Median age (range)	59 (24–93)
Gender (male %)	85/137 (62.0)
ECOG >1 (%)	7/137 (5.1)
B symptoms (%)	15/137 (10.9)
Bulky disease (%)	11/137 (8.0)
Binet (%)	
A	83/136 (61.0)
B	45/136 (33.1)
C	8/136 (5.9)
Rai (%)	
0	31/136 (22.8)
I–II	92/136 (67.6)
III–IV	13/136 (9.5)
High serum LDH (>450 U/L, %)	25/134 (18.7)
High $\beta$ 2-microglobulin (>2.3 mg/L, %)	61/120 (50.8)
ZAP-70 ( $\geq$ 20%)	58/99 (58.6)
CD38 ( $\geq$ 30%)	57/105 (54.3)
Cytogenetics	
13q-	32/80 (40.0)
+12	19/81 (23.5)
11q-	18/78 (23.1)
17p-	8/80 (10.0)
IGHV mutational status (UM > 98%, %)	57/88 (64.8)
First-line treatment (n = 115)	
Alkylators	39/137 (28.5)
Purine analogs	61/137 (44.5)
CHOP regimen	11/137 (8.0)
Others	4/137 (2.9)
Median survival (y)	8.5 (7.3–9.5)

ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group scale of performance status; LDH: lactate dehydrogenase; IGHV: Ig heavy chain V; CHOP: cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone.

**CONTACT** Antonio Martínez  antonmar@clinic.ub.es  Department of Pathology, Hospital Clínic. C/Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain; Gaël Roué  groue@clinic.ub.es  Division of Hematology and Oncology, IDIBAPS, C/Rosselló, 149-153, 08036 Barcelona, Spain  
 \*Gaël Roué and Antonio Martínez share the senior authorship of this manuscript.

 Supplemental data for this article can be accessed [here](#).

© 2017 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group



**Figure 1.** Expression pattern of plasmacytic cell markers and BLIMP-1 isoforms in CLL. (A) Expression of selected plasma-cell markers was detected by immunohistochemical staining of consecutive sections from representative CLL lymph node biopsies, compared with MM (U266) and DLBCL (SUDHL-8) control cell lines. CLL tissue samples harbored several hallmarks of plasmacytic differentiation including increased IRF4 and BLIMP-1 levels, but maintained a homogeneous expression of PAX5. (B) BLIMP-1 expression was analyzed by western blot in whole cell extract from five representative CLL tissue biopsies of lymph nodes, using SUDHL-8, U266 and MM1.S (MM) cell lines as controls.  $\alpha$ -Tubulin was used as a loading control. Shown are the densitometric ratios between each BLIMP-1 isoform and  $\alpha$ -tubulin. (C) PCR determination of the different *PRDM1* transcripts (upper panel) in representative CLL tissue biopsies and lymphoid cell lines. G and B labels refer to endogenous control (GAPDH) and BLIMP-1 PCR products, respectively (lower panel). (D) Subcellular fractionation and western blot analysis of BLIMP-1 isoforms in two representative CLL cell lines.  $\alpha$ -Tubulin and lamin B1 were used as loading control of cytosolic (C) and nuclear (N) fractions, respectively. Total protein contents (T) of each cell lines, as well as SUDHL-8 and U266 cells were used as controls to ascertain the identification of each band. (E) Variation in CD19 and CD38 expression after a 72 h of treatment with interleukin and CpG cocktail, was assessed by flow cytometry. Indicated are the relative median fluorescence intensity (*r*) values observed after cell stimulation (gray curves), and referred to control untreated cells (black curves). (F) CLL cells from peripheral blood treated as above were subjected to western blot analysis of BLIMP-1, IRF4 and PAX5 expression.  $\alpha$ -Tubulin was used as a loading control. CTRL: control; ILs: interleukins.

lymphoma cell line SUDHL-8, used as controls for BLIMP-1 expression (Figure 1(A), see cases #3 and #5). Expression of IRF4 and presence of cytoplasmic immunoglobulin were found concomitantly and with a similar frequency than BLIMP-1 (64/137 cases and 48/137 cases, respectively). In contrast, all the biopsies showed a homogeneous positivity for PAX-5, regardless the levels of BLIMP-1, suggesting that the expression of this latest was not accompanied by the repression of the B-cell program in CLL (Figure 1(A)). By western blot analysis of lymph nodes sections from five representative CLL cases, we further found that CLL cells predominantly expressed the inactive BLIMP-1 $\Delta$ 6 isoform, contrasting with the control cell lines that mainly expressed the  $\alpha$  and  $\beta$  isoforms (Figure 1(B)). This expression profile was independent of mutation in *SF3B1* gene, involved in the regulation of intracellular splicing (Figure S1(A)). Moreover, this feature was almost specific for CLL primary cells, as BLIMP-1 $\alpha$  and/or BLIMP-1 $\beta$  were also predominantly expressed in different leukemia/lymphoma cell lines (Figure S1(B)). To confirm the presence of the corresponding transcripts in CLL biopsies, we designed primers spanning the region presumably deleted within the exon 6 of *PRDM1* (Figure 1(C), upper panel), according to previously published sequences [5], and analyzed the mRNA levels of the different *PRDM1* isoforms in lymph node sections from 50 CLL patients and in representative cell lines. As shown in Figure 1(C) (lower panel) and confirmed by sequencing (Figure S1(C)), all of these samples had detectable mRNA levels of full-length and  $\beta$  *PRDM1*, as well as  $\Delta$ 6 splice variant. To investigate the possible role of these different isoforms in CLL cells, we performed a cell fractionation followed by western blot of the representative CLL cell lines JVM-3 and JVM-13 and in two representative peripheral blood samples from CLL patients. In the cell lines, BLIMP-1 $\alpha$  was principally found in the nuclear fraction while BLIMP-1 $\beta$  was present at similar levels in both nuclear and cytosolic fractions. Regarding BLIMP-1 $\Delta$ 6, although it was expressed in both fractions, it was mainly confined to the cytosolic one (Figure 1(D)). In the two CLL cases, BLIMP-1 $\Delta$ 6 was also localized in the cytosol. Regarding  $\alpha$  and  $\beta$  isoforms, while in patient sample #3 the two bands could be observed in the nucleus, the low enrichment in nuclear proteins impeded their detection in patient sample #2 (Figure S1(D)). We concluded that expression of BLIMP-1 in CLL cells was associated, in a subset of CLL patients, with the presence of a cytosolic, inactive  $\Delta$ 6 isoform of the protein.

B-cell differentiation generally leads to the downregulation of B-cell surface markers (like CD19 and CD20), to the expression of plasma cell markers (CD38 and CD138), and to a switch from surface-bound to cytoplasmic/secreted Igs. Physiologically, these phenotypic changes correlate with decreased expression of B-cell transcription factors (such as PAX5), the expression of plasma cell transcription factors (such as IRF4 and active BLIMP-1) and acquisition of plasma cell morphology [8]. To assess the

role of BLIMP-1 $\Delta$ 6 in terminal plasma cell differentiation in CLL, a set of 3 primary cultures were differentiated into plasma cells upon a 72h stimulation with IL-2, IL-15 and CpG oligonucleotides, as previously described [9]. The completion of CLL B-cell differentiation in these samples was assessed by cytoplasmic immunoglobulin expression and membrane expression of CD19 and CD38. While no detectable modification in intracellular immunoglobulin contents and CD19 expression was found in these samples, in two of them (#2 and #5) we observed an upregulation of CD38 after cytokine treatment (Figure 1(E)). When compared with control unstimulated cells, these modifications were associated with some plasmacellular features like increased cell size, appearance of eccentric nucleus (Figure S1(E) and increased expression of BLIMP-1 $\alpha$ , BLIMP-1 $\beta$  and IRF4 (Figure 1(F)). However, BLIMP-1 $\Delta$ 6 and PAX5 protein levels were not affected by the treatment (Figure 1(F)). Thus, these results suggest that although BLIMP-1 $\Delta$ 6-expressing cells could engage into a plasmacytic differentiation program upon appropriate stimulation, this process is only partial and does not include an effective downregulation of B-cell genes.


In conclusion, expression of the alternative BLIMP-1 $\Delta$ 6 isoform is a new event in CLL, where it may represent a transient inactivation of plasma cell differentiation, similarly to what is observed in patients with MM and T-cell lymphoma, both characterized by high amounts of the alternative, inhibitory BLIMP-1 $\beta$  isoform [10,11]. Although further investigations should be performed to elucidate the mechanism underlying expression of a truncated BLIMP-1 isoform, the possibility to push the associated transient inactivation of plasma cell differentiation towards a plasmablast stage may define new potential targets for biological agents in clinical trials for CLL patients.

**Potential conflict of interest:** Disclosure forms provided by the authors are available with the full text of this article online at <https://doi.org/10.1080/10428194.2017.1330470>.

## Funding

This work was financially supported by Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) PI11/00907 and PI14/00333 (to AM), PI12/01847 and PI15/00102 (to GR), European Regional Development Fund (ERDF) "Una manera de hacer Europa", Redes Temáticas de Investigación Cooperativa de Cáncer RD12/0036/0039 (to EC), and Generalitat de Catalunya 2014SGR795 (to EC). CS and DM were supported by a predoctoral fellowship and a "Río Hortega" contract (CM12/00054) from ISCIII, respectively. This work was carried out at the Esther Koplowitz Center, Barcelona, under the CERCA Program (Generalitat de Catalunya).

## ORCID

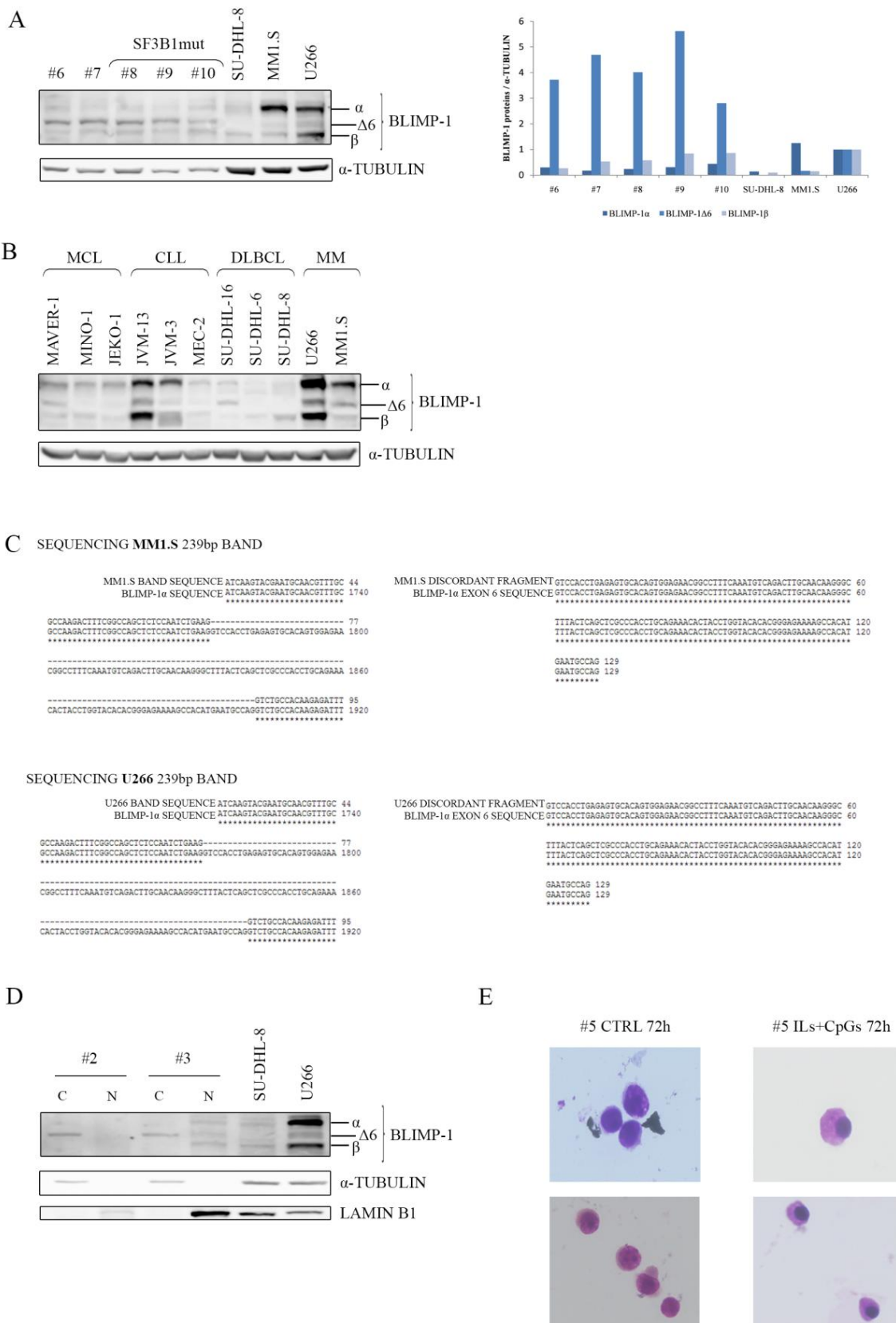
Elías Campo  <http://orcid.org/0000-0001-9850-9793>  
 Gaël Roué  <http://orcid.org/0000-0003-0245-2257>  
 Antonio Martínez  <http://orcid.org/0000-0003-3964-1393>



## References

- [1] Perez-Galan P, Mora-Jensen H, Weniger MA, et al. Bortezomib resistance in mantle cell lymphoma is associated with plasmacytic differentiation. *Blood*. 2011;117:542–552.
- [2] Martinez D, Valera A, Perez NS, et al. Plasmablastic transformation of low-grade B-cell lymphomas: report on 6 cases. *Am J Surg Pathol*. 2013;37:272–281.
- [3] John SA, Garrett-Sinha LA. Blimp1: a conserved transcriptional repressor critical for differentiation of many tissues. *Exp Cell Res*. 2009;315:1077–1084.
- [4] Gyory I, Fejer G, Ghosh N, et al. Identification of a functionally impaired positive regulatory domain 1 binding factor 1 transcription repressor in myeloma cell lines. *J Immunol*. 2003;170:3125–3133.
- [5] Smith MA, Maurin M, Cho HI, et al. PRDM1/Blimp-1 controls effector cytokine production in human NK cells. *J Immunol*. 2010;185:6058–6067.
- [6] Garcia JF, Roncador G, Garcia JF, et al. PRDM1/BLIMP-1 expression in multiple B and T-cell lymphoma. *Haematologica*. 2006;91:467–474.
- [7] Montes-Moreno S, Gonzalez-Medina AR, Rodriguez-Pinilla SM, et al. Aggressive large B-cell lymphoma with plasma cell differentiation: immunohistochemical characterization of plasmablastic lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma with partial plasmablastic phenotype. *Haematologica*. 2010;95:1342–1349.
- [8] Schmidlin H, Diehl SA, Blom B. New insights into the regulation of human B-cell differentiation. *Trends Immunol*. 2009;30:277–285.
- [9] Gutierrez A Jr, Arendt BK, Tschumper RC, et al. Differentiation of chronic lymphocytic leukemia B cells into immunoglobulin secreting cells decreases LEF-1 expression. *PLoS ONE*. 2011;6:e26056.
- [10] Ocana E, Gonzalez-Garcia I, Gutierrez NC, et al. The expression of PRDI-BF1 beta isoform in multiple myeloma plasma cells. *Haematologica*. 2006;91:1579–1580.
- [11] Zhao WL, Liu YY, Zhang QL, et al. PRDM1 is involved in chemoresistance of T-cell lymphoma and down-regulated by the proteasome inhibitor. *Blood*. 2008;111:3867–3871.

Supplemental Figure 1.



**Supplemental Figure 1.** (A) BLIMP-1 expression was analyzed by western blot in 5 CLL peripheral blood samples, including 3 cases with *SF3B* mutations, using SUDHL-8, U266 and MM1.S (MM) cell lines as controls.  $\alpha$ -tubulin was used as a loading control. Shown are the densitometry ratios between each BLIMP-1 isoform and  $\alpha$ -tubulin. (B) Expression of BLIMP-1 isoforms was evaluated as above in a set of cell lines representative for different lymphoid neoplasm. (C) Sequencing of *PRDM1* PCR products. Alignment of the 239bp PCR bands obtained in the two MM cell lines MM1.S and U266 with the *BLIMP-1 $\alpha$*  sequence (NCBI database) highlights a fragment that does not match with full length *BLIMP-1* (left panels), and that corresponds to the exon 6 of *BLIMP-1 $\alpha$*  (right panels). (D) Subcellular fractionation and Western blot analysis of BLIMP-1 isoforms in two peripheral blood samples of CLL patients.  $\alpha$ -tubulin and lamin B1 were used as loading control of cytosolic (C) and nuclear (N) fractions, respectively. SUDHL-8 and U266 cells were used as controls to ascertain the identification of each band. (E) Cell morphology of a representative sample was revealed by standard May-Grünwald Giemsa staining, after treatment with interleukin and CpG cocktail for 72h.

## DISCUSIÓN





Las células plasmáticas son las células efectoras finales de la respuesta humoral del sistema inmune, desarrollándose a partir de los linfocitos B. Las neoplasias de las células B son tumores clonales de linfocitos B que tienden a imitar estadios de diferenciación de linfocitos B normales, y el parecido con los estadios de las células B es la base de su clasificación y nomenclatura <sup>136</sup>. Mientras que muchos de los linfomas malignos presentan un bloqueo en la maduración normal, el bloqueo es incompleto en una porción de los linfomas de células pequeñas, siendo la diferenciación plasmocelular un proceso de maduración común. Esto ocurre en algunos linfomas donde la diferenciación plasmática se espera, como es el caso del linfoma linfoplasmocítico (LPL), y en otros en los que la diferenciación no es frecuente, como en el linfoma folicular (FL) <sup>4,265</sup>, el linfoma de la zona marginal (MZL) <sup>266,267</sup>, el linfoma de células del manto (MCL) <sup>1,7</sup> y la leucemia linfática crónica (CLL) <sup>4,268,269</sup>. Aún no se conoce el significado clínico de esta diferenciación plasmocelular en los linfomas B de bajo grado, aunque se ha visto que podría estar relacionada con la presencia de paraproteína sérica <sup>270</sup>, un estadio avanzado de la enfermedad <sup>271</sup> o resistencia al bortezomib <sup>272</sup>.

Aunque el MCL normalmente no presenta diferenciación plasmocelular se han descrito algunos casos <sup>1-3,7</sup>. Los mecanismos subyacentes de diferenciación plasmocelular en MCL no se conocen del todo, pero se ha visto que SOX11, un factor de transcripción sobreexpresado en MCL, regula directamente el factor de transcripción PAX-5, promoviendo el crecimiento tumoral. PAX-5 mantiene la identidad de célula B y es reprimido cuando la célula empieza la diferenciación a célula plasmática. Además, el silenciamiento experimental de *SOX11* en líneas celulares de MCL lleva a una disminución de la expresión de PAX-5, produciendo un cambio de fenotipo de célula B hacia la diferenciación plasmocelular temprana, con la regulación positiva de BLIMP-1 y XBP-1. Estas observaciones han sugerido que SOX11 puede influir en la patogénesis

del MCL mediante el bloqueo de la diferenciación de célula B <sup>11</sup>. Mediante el estudio de 60 pacientes (SOX11 positivos/SOX11 negativos), se observó que en el MCL las células plasmáticas y la diferenciación terminal de las células B ocurren principalmente en aquellos tumores que son SOX11-negativos <sup>273</sup>. Además, gracias a la expresión de SOX11 se ha podido dividir los MCL en dos grupos diferentes según el pronóstico. En este caso, los pacientes SOX11 positivos son aquellos que tienen una presentación nodal, con predominancia de IGVH poco o no mutadas y con complejidad genómica. Este grupo, definido como convencional, tiene un curso clínico agresivo, a diferencia del grupo indolente (SOX11 negativo) <sup>10</sup>. Por lo tanto, la detección de SOX11 es un marcador de diagnóstico importante en el MCL. La presencia de elevados niveles de mRNA de *SOX11* y la presencia de proteína en localización nuclear se han descrito en la mayoría de los casos, independientemente del estatus de ciclina D1 <sup>12,274</sup>. En nuestro estudio hemos querido evaluar la especificidad de diferentes anticuerpos en cuanto a la detección de SOX11 por inmunohistoquímica (IHQ), y por primera vez comparar los niveles de mRNA de *SOX11* (detectados por PCR cuantitativa) con la expresión proteica. Este estudio es particularmente relevante, ya que diferentes niveles de modificaciones post-transcripcionales o post-traduccionales pueden participar en la regulación de la expresión proteica de SOX11, afectando potencialmente la detección rutinaria de SOX11, realizada por IHQ <sup>275,276</sup>.

En nuestro estudio hemos visto que en los casos de MCL ciclina D1+, la inmunodetección de la proteína con los anticuerpos monoclonales anti-SOX11 <sup>142</sup>, anti-SOX11 <sup>143</sup> y anti-SOX11<sup>MQR-58</sup>, y el anticuerpo policlonal anti-SOX11<sup>SC-17347</sup>, es parecida en aquellos casos caracterizados por unos niveles de mRNA  $\geq 9.57$ , determinado por PCR cuantitativa. En cambio, se ha detectado cierta discordancia en dos casos, en los cuales los niveles de transcritos eran parecidos, y situados cerca del

nivel de detección por IHC. Esto significa que los cambios post-transcripcionales y las modificaciones post-traduccionales no tienen mucho impacto en la detección de la proteína SOX11 por IHQ.

Además, en este trabajo hemos hecho la validación de los anticuerpos por western blot, utilizando una línea celular de MCL que no expresa SOX11 (JVM2)<sup>277</sup> y una línea no MCL (HEK293) donde hemos sobreexpresado por un lado SOX11, por otro SOX4<sup>277,278</sup>. Gracias a ello hemos visto que el anticuerpo monoclonal anti-SOX11<sup>142</sup> y el anti-SOX11<sup>143</sup> reconocen SOX4, aunque en menor medida que SOX11, y que tanto el anticuerpo policlonal anti-SOX11<sup>sc-17347</sup> como el monoclonal anti-SOX11<sup>MQR-58</sup> reconocen sólo SOX11. No obstante, el anticuerpo anti-SOX11<sup>143</sup> era cuatro veces más específico y más sensible que el anti-SOX11<sup>142</sup>, y también más sensible que el policlonal anti-SOX11<sup>sc-7347</sup>. Por otro lado, el anticuerpo monoclonal anti-SOX11<sup>MQR-58</sup> tenía elevada sensibilidad y especificidad para SOX11.

Además de estudiar la detección de SOX11 en el MCL, hicimos también la tinción de 209 linfomas de muestras parafinadas con los diferentes anticuerpos, para evaluar si se podrían utilizar en el diagnóstico de rutina. Vimos que todos los casos positivos, usando los dos anticuerpos monoclonales anti-SOX11<sup>143</sup> y anti-SOX11<sup>MQR-58</sup>, presentaban una tinción nuclear diferente, siendo aún más heterogénea cuando utilizamos el anticuerpo policlonal anti-SOX11<sup>sc-17347</sup>. En resumen, los 9 casos de MCL ciclina D1- eran SOX11+ utilizando ambos anticuerpos monoclonales, mientras que 73% y 84% de los ciclina D1+ presentaban una positividad con el anti-SOX11<sup>143</sup> y el anti-SOX11<sup>MQR-58</sup>, respectivamente, aunque más atenuada con este último anticuerpo. En el caso de los demás linfomas, con el anti-SOX11<sup>MQR-58</sup> todos los casos eran negativos para SOX11 mientras que un 18% y un 7% de positividad se observaba con el anti-SOX11<sup>sc-17347</sup> y el anti-SOX11<sup>143</sup>, respectivamente. Además, 2/43 casos de DLBCL dieron una tinción



débil para SOX11 con el anti-SOX11<sup>143</sup>, pero en ausencia del transcrito *SOX11*. Esto indicaría, junto a la reactividad cruzada con SOX4 por western blot, que en algunos casos donde tenemos una débil tinción nuclear, esta señal podría ser debida a SOX4, a raíz de la elevada homología entre ambas proteínas. A favor de esta hipótesis, estudios previos de perfiles de expresión génica han demostrado que algunos DLBCLs expresaban SOX4 pero no SOX11<sup>279</sup>. Asimismo, se ha observado una débil positividad para SOX11 con el anticuerpo anti-SOX11<sup>143</sup> en células foliculares dendríticas (FDCs) y en las células de las vénulas endoteliales altas (HEVs), sobretodo en casos de linfoma T angioinmunoblástico. Aquí también, las primeras observaciones apuntaban a que esta señal podría ser debida a la reacción cruzada con SOX4, pero estudios ulteriores demostraron un patrón de expresión similar con el anticuerpo anti-SOX11<sup>sc-17347</sup>, que no reconoce SOX4. Apoyando la idea de que SOX11 estaría presente en ambas poblaciones de células, se ha descrito la presencia de la proteína en las células endoteliales y en las FDCs del MCL *in situ*<sup>280</sup>. Serían necesarios más estudios para poder establecer el papel de SOX11 como posible marcador de estas poblaciones celulares y de los tumores derivados.

Por otra parte, aunque en la leucemia de las células pilosas (HCL) se ha descrito que los casos ciclina D1+ presentaban una positividad para SOX11<sup>14,15</sup>, en ninguno de los 5 casos de HCL incluidos en nuestra cohorte (3 ciclina D1+ y 2 ciclina D1-) pudimos detectar la proteína con los anticuerpos monoclonales anti-SOX11<sup>143</sup> y anti-SOX11<sup>MQR-58</sup>. Esta observación corrobora lo que se ha visto en un estudio utilizando otro anticuerpo monoclonal, el anti-SOX11<sup>17</sup>, en muestras en las que tampoco se pudo detectar el mRNA de *SOX11*<sup>13</sup>. De manera parecida, SOX11 no se encuentra en las células plasmáticas de casos de mieloma de ciclina D1+, algunos de los cuales tienen la misma t(11;14) que el MCL<sup>12,14,15</sup>. En cambio, algunos linfomas carentes de la t(11;14)

presentan expresión de SOX11 como es el caso del BL, del linfoma linfoblástico de células T y del linfoma linfoblástico de células B <sup>12,14,274,281</sup>. Esto indicaría que la expresión de ciclina D1 y la expresión de SOX11 son fenómenos independientes.

Con estos resultados podemos concluir que tanto el anticuerpo monoclonal anti-SOX11<sup>143</sup> como el anti-SOX11<sup>MQR-58</sup> son una buena opción para la detección de SOX11 en muestras en parafina (FFPE). Mediante estos anticuerpos ninguno de los casos estudiados han presentado tinción inespecífica citoplasmática, que si sucede con los anticuerpos policlonales utilizados previamente <sup>12,13</sup>. Aunque el anticuerpo anti-SOX11<sup>MQR-58</sup> parece ser más específico y más sensible para SOX11 por western blot, hemos visto que el anti-SOX11<sup>143</sup> podría ser más sensible en IHC.

Cierto grado de diferenciación plasmocelular se encuentra también en la CLL/SLL, aunque la gran mayoría de los casos carece de diferenciación a células plasmáticas. Por ello, en el pasado algunas CLLs/SLLs fueron clasificadas como linfoma “linfoplasmocitoide”. La inmunoglobulina citoplasmática puede encontrarse en secciones en parafina en la mayoría de CLLs/SLLs, mientras los centros de proliferación son característicamente IRF-4/MUM1+ <sup>5</sup>. *PRDMI*/BLIMP-1 está presente en las neoplasias de las células plasmáticas, en el linfoma linfoplasmocítico, en un número significativo de DLBCLs y en 15% de las CLLs/SLLs <sup>6</sup>. *In vitro* la diferenciación de las células de CLL a células secretoras de inmunoglobulinas se asocia a un aumento de la expresión de BLIMP-1 y una disminución de LEF-1 <sup>18,282</sup>. La diferenciación plasmocelular puede expresarse en gran medida fenotípicamente sin una morfología obvia de célula plasmática o sin células plasmáticas fácilmente reconocibles <sup>283</sup>. En estos casos, la distinción con el linfoma linfoplasmocítico se basa en la presencia de MYD88 *wild type* y de la positividad para LEF-1, siendo este último un marcador muy sensible y específico de CLL/SLL <sup>284</sup>.

En nuestro estudio hemos observado que la expresión de BLIMP-1 en CLL es mucho más frecuente de lo previamente descrito<sup>6</sup>. No obstante, hemos relacionado la expresión de BLIMP-1 con una expresión incompleta del resto de componentes necesarios para la diferenciación a célula plasmática, de manera que este factor se encontraría inactivado o con una actividad reducida en la CLL. Se ha descrito que BLIMP-1 se encuentra inactivado en las neoplasias de células B a través de varios mecanismos. En las células mieloides y en los pacientes con linfomas de células T se han detectado altos niveles de la isoforma inactiva BLIMP-1 $\beta$ <sup>108,285</sup>. Esta isoforma se caracteriza por una actividad reducida como represor transcripcional y por su capacidad de interferir con la forma BLIMP-1 $\alpha$ , de manera que una elevada expresión de la forma  $\beta$  puede producir una importante reducción global de la actividad represiva de BLIMP-1 en estas células. Otra evidencia de una menor actividad de BLIMP-1 en los tumores plasmacíticos, es que las células malignas de pacientes de macroglobulinemia de Waldenström expresan menos niveles de BLIMP-1 que las células plasmáticas normales<sup>286</sup>. Además, el gen *PRDM1* se encuentra localizado en el cromosoma 6q21-q22.1, una región eliminada frecuentemente en los linfomas<sup>287,288</sup>. Incluso cuando esta región no está eliminada, la actividad de BLIMP-1 puede estar comprometida. Por ejemplo, en el DLBCL BLIMP-1 es incapaz de activar la diferenciación a célula plasmática, como consecuencia de la existencia de mutaciones inactivadoras de BLIMP-1 o bien debido a que las células son incapaces de traducir una proteína BLIMP-1 funcional<sup>289,290</sup>. Finalmente, ETS-1, un oncogén sobreexpresado en algunos tumores, como en el cáncer de mama, el carcinoma hepatocelular, el cáncer de ovarios y en el cáncer de esófago<sup>291-294</sup>; y sujeto a amplificación en ciertas leucemias y linfomas, como la leucemia mielomonocítica aguda y el DLBCL<sup>295-297</sup>. ETS-1 puede bloquear la unión al DNA y la actividad biológica de BLIMP-1<sup>298</sup>. Asimismo, los tumores que sobreexpresan ETS-1 tienen una

disminución de la actividad de BLIMP-1, a pesar de no tener ninguna mutación en la secuencia del gen <sup>295</sup>.

En nuestro trabajo, hemos analizado la expresión de BLIMP-1 por IHQ en un grupo de pacientes con CLL, y hemos visto que el 31% de los pacientes eran positivos para este factor. Con la misma frecuencia encontramos la presencia de IRF-4 y de inmunoglobulinas citoplasmáticas. No obstante, todas las biopsias presentan expresión de PAX-5, lo que sugiere que la expresión de factores de transcripción típicos de diferenciación plasmocelular no van acompañados de la represión del programa de célula B en la CLL, como ya se había detectado en estudios anteriores <sup>18,299</sup>. Por ello, hemos validado la expresión de BLIMP-1 por western blot y hemos observado que la isoforma mayoritaria en los pacientes de CLL era la isoforma alternativa BLIMP-1 $\Delta$ 6, la cual se ha descrito anteriormente como una isoforma inactiva que puede interferir con la proteína activa BLIMP-1 $\alpha$  mediante la formación de heterodímeros <sup>300</sup>. Algunos de los pacientes presentaban expresión de las otras isoformas: BLIMP-1 $\alpha$  y BLIMP-1 $\beta$ , pero unos niveles sensiblemente inferiores. Frente a esta expresión de una isoforma alternativa de BLIMP-1, comprobamos si los pacientes presentaban alguna alteración en la secuencia del gen *PRDMI* y confirmamos la ausencia de mutaciones, deleciones, o modificaciones epigenéticas en nuestra serie. Se ha descrito que uno de los genes más frecuentemente mutados en los pacientes con CLL (5-18% de los casos) es el factor de splicing 3b1 (*SF3B1*). En estos casos, se cree que la alteración del *splicing* puede ser un mecanismo importante en el desarrollo de la enfermedad <sup>301</sup>. Analizamos la expresión de BLIMP-1 en muestras de sangre periférica de un grupo de pacientes con CLL, portadores o no de mutaciones en el gen *SF3B1*, y vimos que la expresión de la isoforma BLIMP-1 $\Delta$ 6 era independiente del estado mutacional de *SF3B1*. Por lo tanto, en CLL la actividad de BLIMP-1 parece estar inactivada por la expresión preferencial

de la isoforma inactiva BLIMP-1 $\Delta$ 6, la cual se ha visto que sería casi exclusiva de CLL, ya que la hemos detectado de forma minoritaria en líneas celulares de otros tipos de linfomas, frente a las otras isoformas. Sería necesaria una investigación más profunda para esclarecer el mecanismo por el cual las células expresan preferencialmente la isoforma BLIMP-1 $\Delta$ 6 en pacientes con CLL.

Las isoformas de BLIMP-1 se expresan en las células B normales en diferentes estadios de su diferenciación. En general, las células B tienen niveles de BLIMP-1 $\beta$  sustancialmente menores que los de la isoforma activa. Sin embargo, BLIMP-1 $\Delta$ 7/6 cambia su expresión durante el proceso de diferenciación. Se demostró que la isoforma BLIMP-1 $\Delta$ 7/6 se expresaba preferentemente en las células B vírgenes donde puede regular los niveles de BLIMP-1 $\alpha$ . La activación de estas células produce una disminución masiva de la expresión de la isoforma BLIMP-1 $\Delta$ 7/6, permitiendo la expresión de BLIMP-1 $\alpha$  y la inducción de diferenciación final a célula plasmática<sup>103</sup>. Con el fin de estudiar una posible interrelación entre esta isoforma y las demás isoformas en la CLL, decidimos estudiar su localización intracelular en líneas celulares de CLL. Vimos que hay una co-expresión de BLIMP-1 $\Delta$ 6 y BLIMP-1 $\alpha$  en el citoplasma y en el núcleo de las células, aunque la primera se encuentra principalmente en el citoplasma mientras la segunda se detecta principalmente en el núcleo, lo que sugiere que BLIMP-1 $\Delta$ 6 podría interactuar con BLIMP-1 $\alpha$ . Las muestras primarias de CLL mostraron el mismo patrón de localización, pero con una prevalencia de la isoforma BLIMP-1 $\Delta$ 6, localizada principalmente en el citoplasma. Todos estos datos sugieren que la expresión de BLIMP-1 $\Delta$ 6 en la CLL puede ser un mecanismo regulador de la expresión de la forma activa BLIMP-1 $\alpha$ , destinado a evitar la diferenciación completa a célula plasmática de estas células tumorales.

Para confirmar la presencia de la isoforma BLIMP-1 $\Delta$ 6 en los pacientes de CLL, hicimos la detección del transcrito de *BLIMP-1 $\Delta$ 6* mediante el diseño de unos cebadores que abarcan el exón eliminado (exón 6)<sup>300</sup> en 50 ganglios linfáticos de pacientes de CLL y en las líneas celulares. En todos los casos detectamos en menor o mayor medida la presencia del transcrito de *BLIMP-1 $\Delta$ 6*. Confirmamos que se trataba de *BLIMP-1 $\Delta$ 6* mediante el aislamiento y la secuenciación de la banda en dos líneas de mieloma.

Según el mecanismo clásico, la diferenciación de las células B lleva a una reducción de los marcadores de membrana de célula B (CD19 y CD20), la expresión de marcadores de célula plasmática (CD38 y CD138) y un cambio de inmunoglobulinas expuestas a la superficie a inmunoglobulinas citoplasmáticas/secretadas. Estos cambios fenotípicos correlacionan con una disminución de la expresión de factores de transcripción de las células B (como PAX-5), la expresión de factores de transcripción de células plasmáticas (como IRF-4 y BLIMP-1 activo) y la adquisición de la morfología de célula plasmática con un núcleo excéntrico y un citoplasma abundante, necesario para la secreción de anticuerpos<sup>302</sup>. Nuestros datos muestran que cuando las células de pacientes con CLL son estimuladas con IL-2, IL-15 y CpGs según un protocolo establecido<sup>282</sup>, obtenemos un aumento de BLIMP-1 $\alpha$  en todos los casos. No obstante, la diferenciación a célula plasmática queda incompleta, ya que frente al aumento de CD38 (en dos de los pacientes), IRF-4, y BLIMP-1 $\alpha$  y la aparición de morfología celular compatible con diferenciación plasmocelular (tamaño más grande, núcleo excéntrico y citoplasma mayor), sólo se observó una pequeña o nula disminución de CD19 y PAX-5, sin modificaciones en los niveles de expresión de las isoformas inactivas de BLIMP-1. Nuestra observación corrobora un estudio previo, donde también se ha visto que la diferenciación de las células de pacientes de CLL es incompleta, presentando algunas características de célula B y otras de células plasmáticas<sup>18</sup>. Al margen de la CLL, la

coexpresión de factores de transcripción “opuestos” se ha descrito también en el estadio de plasmablasto de las células B <sup>303</sup>.

En conclusión, los dos estudios presentados en esta tesis doctoral están relacionados con la diferenciación plasmocelular en dos tipos de NHLs. Por un lado vemos que es necesaria una correcta detección de SOX11, sobretodo en el MCL, donde su expresión divide los MCLs en convencionales e indolentes. Los casos de MCL SOX11 negativos se han relacionado con diferenciación plasmocelular y mejor pronóstico (MCL indolentes) <sup>10,11,273</sup>. Y por otro lado vemos que BLIMP-1, el principal regulador de la diferenciación a célula plasmática, está principalmente representado en las células de CLL por la isoforma inactiva BLIMP-1 $\Delta$ 6. Esta expresión preferencial de BLIMP-1 $\Delta$ 6 se asocia a una inactivación transitoria de la diferenciación plasmablástica, ya que mediante estimulación, las células de CLL son capaces de diferenciarse a estadio de plasmablasto. La posibilidad de diferenciar las células puede definir nuevas dianas terapéuticas para pacientes de CLL. Actualmente, la terapia de diferenciación se está utilizando en ciertas enfermedades hematológicas, principalmente en las leucemias agudas <sup>304</sup> y está siendo investigada en las células madre tumorales como un medio para erradicar esta población tumoral <sup>305,306</sup>.

## CONCLUSIONES







1. En la detección de SOX11 por IHQ, los cambios post-transcripcionales y las modificaciones post-traduccionales no tienen impacto en la detección de esta proteína.
2. Los anticuerpos monoclonales anti-SOX11<sup>143</sup> y anti-SOX<sup>MQR-58</sup>, son los más sensibles detectando SOX11. Aunque de los dos, el anti-SOX<sup>MQR-58</sup> es el único que no detecta SOX4 y, por lo tanto, es más específico.
3. La detección por IHQ con los anticuerpos seleccionados, en muestras de MCL y otros linfomas, es más débil con el anti-SOX<sup>MQR-58</sup> que con el anti-SOX11<sup>143</sup>. De manera que, para la utilización en IHQ, sería más indicado el anti-SOX11<sup>143</sup>, ya que con el otro anticuerpo podríamos estar perdiendo poblaciones de células poco positivas para SOX11.
4. Las células foliculares dendríticas y las células de las vénulas del endotelio alto son SOX11+. Son necesarios más estudios para esclarecer el papel de SOX11 como marcador de estas poblaciones celulares y para los tumores derivados de estas.
5. La expresión de ciclina D1 y la expresión de SOX11 son fenómenos independientes.
6. La expresión de BLIMP-1 en los pacientes de CLL es mucho más frecuente de lo que se había descrito previamente.
7. La expresión de BLIMP-1 por IHQ correlaciona con los niveles de IRF-4 pero no con los niveles de PAX-5.
8. Los pacientes de CLL expresan mayoritariamente la isoforma BLIMP-1Δ6, tanto en nódulos linfáticos como sangre periférica, independientemente del estatus de *SF3B1*.

9. La expresión mayoritaria de BLIMP-1 $\Delta$ 6 es una característica casi exclusiva de CLL. Se ha detectado la expresión de BLIMP-1 $\Delta$ 6 en otros tipos de linfomas, pero con predominancia de las otras isoformas.
10. En todos los pacientes con CLL analizados, se detecta el mRNA de la isoforma *BLIMP-1 $\Delta$ 6*.
11. La estimulación de las células primarias de CLL con IL-2, IL-15 y CpGs produce una diferenciación incompleta de los linfocitos B de CLL. Se producen cambios morfológicos en las células con un aumento de CD38, IRF-4 y BLIMP-1 $\alpha$ , pero sin modificación en los niveles de CD19, PAX-5 y las isoformas inactivas de BLIMP-1.
12. En la CLL, la diferenciación plasmocelular se encontraría bloqueada por la expresión de la isoforma alternativa BLIMP-1 $\Delta$ 6. Serán necesarios estudios adicionales para esclarecer el mecanismo por el cual estas células expresan esta isoforma.

**ANEXO I**





## Material y métodos artículo II (Leukemia & Lymphoma)

### Muestras de pacientes

Se han recogido muestras de 137 pacientes en un solo instituto entre el 1990 y 2012. Se incluyeron en este estudio las muestras diagnosticadas como CLL siguiendo los criterios histológicos estándar y la clasificación de la WHO<sup>136</sup>. Se ha obtenido el consentimiento informado de todos los pacientes, de acuerdo con la junta de revisión institucional del Hospital Clínic (Barcelona, España) y de acuerdo con las directrices del comité de ética local. Los datos clínicos y biológicos en el momento del diagnóstico se muestran en la tabla 1 del artículo II. El origen de la biopsia fue el nódulo linfático (116 casos), el bazo (3 casos) o los tejidos extranodales (18 casos). En todos los casos se ha estudiado, en sangre y tejido, la presencia de características de diferenciación a plasmocelular, incluyendo núcleo excéntrico, cambios en la cromatina, expansión citoplasmática y la presencia de cuerpos de Russel y Dutcher. El inmunofenotipo de célula plasmática se evaluó mediante la expresión de CD138 y la pérdida de PAX-5. La secreción de inmunoglobulinas es una característica de las células plasmáticas funcionales ampliamente usado para identificar la diferenciación completa a célula plasmática. La expresión de inmunoglobulinas citoplasmáticas por inmunohistoquímica, utilizado comúnmente como sustituto a la detección de secreción de inmunoglobulinas, ha sido el método utilizado para determinar la diferenciación secretora<sup>271,307</sup>. En este contexto, la diferenciación completa a célula plasmática se define por darse al mismo tiempo: la morfología, el inmunofenotipo y la diferenciación secretora. La diferenciación plasmocelular defectuosa se define por la pérdida de la morfología celular y la diferenciación secretora, en asociación con un inmunofenotipo incompleto de célula plasmática.

### Inmunohistoquímica

Los estudios inmunohistoquímicos se realizaron con un panel de anticuerpos monoclonales y policlonales en cortes de muestras parafinadas (Tabla 1, Anexo I). Se utilizó un sistema de detección por peroxidasa, protocolos estándar de recuperación de antígeno y máquinas de tinción automatizadas (DakoAutostainer, Glostrup, Denmark and Bond Max, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). Para IRF-4, BLIMP-1 y XBP-1 sólo se ha considerado la tinción nuclear, ya que estos factores se localizan predominantemente en el núcleo. Los casos se han considerado positivos si más del 20% de las células tumorales eran positivas.

El anticuerpo de BLIMP-1 utilizado, se ha diseñado contra los aminoácidos 176-307 de BLIMP-1 $\alpha$ <sup>308</sup>. El anticuerpo BLIMP-1 ROS195 reconoce la región carboxilo terminal de BLIMP-1 $\alpha$ , que es común para las tres isoformas de BLIMP-1 (BLIMP-1 $\alpha$ , BLIMP-1 $\beta$  y BLIMP-1 $\Delta$ 6).

### Líneas celulares y condiciones de cultivo

Las siguientes 11 líneas celulares representan los NHLs estudiados para la expresión de BLIMP-1: SU-DHL-6, SU-DHL-16, SU-DHL-8 (DLBCL), MAVER-1, MINO, JEKO-1 (MCL), MM1.S y U266 (MM), MEC-2, JVM-3 y JVM-13 (CLL). Todas las líneas celulares se han obtenido del ATCC (Manssas, VA) o del Leibniz-Institute DSMZ (Braunschweig, Alemania). Todas las líneas celulares se han cultivado en medio RPMI 1640 o IMDM (MEC-2) complementado con 10-20% de suero fetal (FBS), 2mM de glutamina y 50 $\mu$ g/mL de penicilina-estreptomicina (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD). Los cultivos se han mantenido a 37°C con el 5% de dióxido de carbono.

### Extracción de proteínas y western blot

Células en crecimiento exponencial (aproximadamente  $10^6$  células/mL) se han lisado mediante el buffer RIPA (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) y las muestras de tumores congelados se han lisado mediante T-PER (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EUA), añadiendo en ambos casos el cóctel inhibidor de fosfatasa y proteasas (Thermo Fisher Scientific). La cuantificación de las muestras se ha hecho mediante Bio-Rad protein assay (Bio-Rad laboratorios, Hercules, CA, EUA) siguiendo las instrucciones del producto. Hemos utilizado la misma cantidad de proteína total de cada extracto (30-50 $\mu$ g del total extraído) para determinar la cantidad específica de proteínas. Las muestras se han reducido mediante Laemmli Sample Buffer con DTT y se han separado por electroforesis en un gel SDS-PAGE del 7%. Después se han transferido las proteínas a una membrana Immobilon-P con tamaño de poro de 0.45 $\mu$ m (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), y las membranas se han bloqueado con 50mmol/L de buffer Tris pH 7,6 con Tween 20 (TBST) y con un 5% de leche en polvo sin grasas.

En el caso del lisado para obtener las fracciones subcelulares, el pellet de células se ha resuspendido en un buffer hipotónico (10mM Tris-HCl pH 7.4, 10mM NaCl, 3mM MgCl<sub>2</sub> y 0.05% NP-40) para la obtención de la fracción citosólica. El pellet con la fracción nuclear se ha resuspendido en buffer RIPA (Sigma Aldrich), utilizando en ambos casos el inhibidor de proteasas y fosfatasa (Thermo Fisher Scientific). Obteniendo de ese modo la fracción de proteínas citoplasmáticas y la fracción de proteínas nucleares.

Las membranas se han incubado con el anti-BLIMP-1, anti-IRF-4, anti-PAX-5, anti-LaminB1 y anti- $\alpha$ -tubulina, este último como control de carga (Tabla 2, Anexo I). La



unión del anticuerpo primario se ha detectado mediante anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa del rábano picante (HRP) (Tabla 3, Anexo I), y luego hemos revelado mediante la utilización de sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Femto o Pierce ECL Western Blotting (ambos de Thermo Fisher Scientific). Las imágenes se han visualizado y analizado en la cámara mini LAS4000 y el programa informático Multi GAUGE (Fujifilm, Tokyo, Japón).

#### Extracción de RNA, síntesis de cDNA y PCR

El RNA se ha extraído de los pellets de células congelados y de secciones de tejido congelado, siguiendo el protocolo estándar de extracción de RNA con TRIZOL. La síntesis de DNA complementario se ha hecho a partir de 500ng de RNA total y se ha generado utilizando la siguiente mezcla: tampón para la hebra molde, DTT, dNTPs y pd(N)<sub>6</sub>, como enzima de retro-transcripción la M-MLVRT (Invitrogen, Life Technologies) y el inhibidor de ribonucleasa (Promega, Madison, Wisconsin, EUA). La PCR se ha hecho mediante los siguientes cebadores:

Para BLIMP-1 humano (utilizando cebadores que abarca el exón 6):

El cebador directo: 5'-ACA TGA CCG GCT ACA AGA CC-3' (exón 5)

El cebador reverso: 5'-GCA GTT TCA GGT GCA CAA AC-3' (exón 7)

Y para GAPDH humano:

El cebador directo: 5'-CTC ATG ACC ACA GTC CAT GC-3'

El cebador reverso: 5'-TTC TAG ACG GCA GGT CAG GT-3'.

La PCR para amplificar el cDNA de BLIMP-1 y GAPDH, con los cebadores descritos, se ha hecho con la polimerasa AmpliTaq Gold®360 DNA polymerase (AppliedBiosystems, Life Technologies), siguiendo las indicaciones del producto. Los productos de la PCR se han analizado en un equipo de electroforesis capilar QIAxcel Advanced Instrument (Quiagen, Venlo, Holanda). Para la secuenciación de la banda BLIMP-1Δ6 resultante de la PCR, el producto de la PCR de BLIMP-1 se ha cargado en un gel de agarosa del 2%. La banda correspondiente a BLIMP-1Δ6 se ha purificado del gel, utilizando el kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Düren, Alemania), se mandó a secuenciar a Beckman Coulter Genomics (Technelysium, South Brisbane, Australia) y se analizó con el programa ClustalW2 (EMBL-EBI, Cambridge, Reino Unido), utilizando las secuencias de referencia de la base de datos Ensembl (creada por EMBL-EBI y Wellcome Trust Sanger Institute).

#### Diferenciación plasmocelular *in-vitro* de pacientes de CLL

Linfocitos de sangre periférica de tres pacientes de CLL se han cultivado en un medio libre de FBS, el AIM-V (*adoptive immunotherapy media-V*) (Gibco-Invitrogen). Para la estimulación de los linfocitos B, las células se han cultivado durante 72h en medio AIM-V (control) o en medio AIM-V complementado con 2.5µg/mL CpG ODN2006 (InvivoGen, San Diego, CA, EUA), 10ng/mL de IL-15 humana (Sigma-Aldrich) y 94IU/mL de IL-2 humana (Sigma-Aldrich). La morfología celular de las células primarias controles y diferenciadas a 72h se ha evaluado mediante tinción Giemsa con la utilización de Thinprep (Hologic, Inc. Marlborough, MA, EUA).

### Citometría de flujo

La diferenciación plasmocelular *in vitro* se ha evaluado por citometría de flujo con el citómetro Attune® Acoustic Focusing Cytometer y se han analizado los resultados con el programa Attune® Cytometric-Software (Applied Biosystems). Se utilizaron los anticuerpos anti-CD19, anti-CD38 y sus correspondientes controles isotípicos (Tabla 4, Anexo I). Además, también se ha hecho un seguimiento de la apoptosis – muerte celular, por citometría, mediante el kit de detección AnnexinV-FITC Apoptosis detection kit (BMS500FI, Affimetrix eBioscience, San Diego, CA, EUA).

**TABLA 1. ANEXO I**

ANTICUERPO	CLON	ESPECIFICIDAD	ESPECIE (HOST)	DILUCIÓN	PROVEEDOR	REF.	RECUPERACIÓN VISUALIZACIÓN
<b>BLIMP-1</b>	ROS195	Humano	Ratón	1:10	CNIO*	-	CC1 pH 7.5 UltraView
<b>IRF-4</b>	MUM1p	Humano	Ratón	1:100	DAKO	M7259	EDTA 1Mm pH 9 Envision Flex
<b>PAX-5</b>	DAK-PAX5	Humano	Ratón	RTU	DAKO	M7307	EDTA 1Mm pH 9 Envision Flex
<b>BCL6</b>	PG-B6p	Humano	Ratón	RTU	DAKO	IS625	EDTA 1Mm pH 9 Envision Flex
<b>XBP-1</b>	Policlonal	Humano	Conejo	1:100	Santa Cruz	sc-7160	EDTA 1Mm pH 8 Refine Polymer Detection System
<b>CD138</b>	MI15	Humano	Ratón	RTU	DAKO	IS642	EDTA 1Mm pH 9 Envision Flex
<b>ZAP70</b>	2F3.2	Humano	Ratón	RTU	DAKO	IS653	EDTA 1Mm pH 9 Envision Flex
<b>CADENA κ</b>	Policlonal	Humano	Conejo	1:16.000	DAKO	IS506	Citrato 10mM pH 6 Envision Flex
<b>CADENA λ</b>	Policlonal	Humano	Conejo	1:16.000	DAKI	IS507	Citrato 10mM pH 6 Envision Flex

**Tabla 1. Anticuerpos utilizados para la inmunohistoquímica**, casa comercial y condiciones en las que se ha utilizado. \*El anticuerpo de BLIMP-1 ha sido proporcionado por Giovanna Roncador (CNIO). UltraView (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, EUA), Envision Flex (DAKO, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA), Refine Polymer Detection System (Leyca Microsystems, GmbH, Wetzlar, Alemania). REF, referencia; RTU, listo para usar (*Ready To Use*).

TABLA 2, ANEXO I

ANTICUERPO	CLON	ESPECIFICIDAD	ESPECIE (HOST)	DILUCIÓN	PROVEEDOR	REF.
<b>BLIMP-1</b>	ROS195	Humano	Ratón	1:500	CNIO	-
<b>IRF-4</b>	Policlonal	Humano	Cabra	1:200	Santa Cruz	sc-6059
<b>PAX-5</b>	Policlonal	Humano	Cabra	1:500	Santa Cruz	sc-1974
<b>LAMIN B1</b>	Policlonal	Humano	Conejo	1:1.000	Abcam	Ab16048
<b><math>\alpha</math>-TUBULINA</b>	B-5-1-2	Humano	Ratón	1:5.000	Sigma	T6074

Tabla 2. Anticuerpos primarios, utilizados para los western blots del Artículo II. Ref., referencia.

TABLA 3, ANEXO I

ANTICUERPO	CLON	ESPECIFICIDAD	ESPECIE (HOST)	DILUCIÓN	PROVEEDOR	REF.
<b>IgG-HRP</b>	Policlonal	Ratón	Cabra	1:5.000	Sigma	A9044
<b>IgG-HRP</b>	Policlonal	Conejo	Cabra	1:5.000	Sigma	A0545
<b>IgG-HRP</b>	Policlonal	Cabra	Conejo	1:2.000	Santa Cruz	sc-2768

Tabla 3. Anticuerpos secundarios, utilizados en los western blots del Artículo II, todos ellos conjugados a la peroxidasa del rabano picante (HRP).

TABLA 4, ANEXO 1

ANTICUERPO	ISOTIPO	FLUOROCROMO	ESPECIFICIDAD	ESPECIE (HOST)	PROVEEDOR	REF.
<b>CD19</b>	IgG1 $\kappa$	FITC	Humano	Ratón	BD	345788
<b>CD38</b>	IgG1 $\kappa$	PE	Humano	Ratón	BD	555460
<b>IgG1</b>	IgG1 $\kappa$	FITC	Humano	Ratón	Beckman	A07795
<b>IgG1</b>	IgG1 $\kappa$	PE	Humano	Ratón	BD	555749

Tabla 4. Anticuerpos y controles isotípicos para citometría, utilizados en la citometría del Artículo II.

## REFERENCIAS





1. Visco, C. *et al.* Molecular characteristics of mantle cell lymphoma presenting with clonal plasma cell component. *Am J Surg Pathol* **35**, 177-89 (2011).
2. Naushad, H. *et al.* Mantle cell lymphoma with flow cytometric evidence of clonal plasmacytic differentiation: a case report. *Cytometry B Clin Cytom* **76**, 218-24 (2009).
3. Cooper, C.L., Joshua, D.E., Lee, C.S., Eysers, A.A. & Cooper, W.A. Extranodal plasmablastic lymphoma arising in mantle cell lymphoma. *Histopathology* **51**, 856-9 (2007).
4. Martinez, D. *et al.* Plasmablastic transformation of low-grade B-cell lymphomas: report on 6 cases. *Am J Surg Pathol* **37**, 272-81 (2013).
5. Tandon, B., Swerdlow, S.H., Hasserjian, R.P., Surti, U. & Gibson, S.E. Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma: another neoplasm related to the B-cell follicle? *Leuk Lymphoma* **56**, 3378-86 (2015).
6. Garcia, J.F. *et al.* PRDM1/BLIMP-1 expression in multiple B and T-cell lymphoma. *Haematologica* **91**, 467-74 (2006).
7. Young, K.H. *et al.* Mantle cell lymphoma with plasma cell differentiation. *Am J Surg Pathol* **30**, 954-61 (2006).
8. Xu, W. & Li, J.Y. SOX11 expression in mantle cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* **51**, 1962-7 (2010).
9. Navarro, A. *et al.* Molecular subsets of mantle cell lymphoma defined by the IGHV mutational status and SOX11 expression have distinct biologic and clinical features. *Cancer Res* **72**, 5307-16 (2012).
10. Fernandez, V. *et al.* Genomic and gene expression profiling defines indolent forms of mantle cell lymphoma. *Cancer Res* **70**, 1408-18 (2010).
11. Vegliante, M.C. *et al.* SOX11 regulates PAX5 expression and blocks terminal B-cell differentiation in aggressive mantle cell lymphoma. *Blood* **121**, 2175-85 (2013).
12. Mozos, A. *et al.* SOX11 expression is highly specific for mantle cell lymphoma and identifies the cyclin D1-negative subtype. *Haematologica* **94**, 1555-62 (2009).
13. Ek, S., Dictor, M., Jerkeman, M., Jirstrom, K. & Borrebaeck, C.A. Nuclear expression of the non B-cell lineage Sox11 transcription factor identifies mantle cell lymphoma. *Blood* **111**, 800-5 (2008).
14. Dictor, M. *et al.* Strong lymphoid nuclear expression of SOX11 transcription factor defines lymphoblastic neoplasms, mantle cell lymphoma and Burkitt's lymphoma. *Haematologica* **94**, 1563-8 (2009).
15. Chen, Y.H., Gao, J., Fan, G. & Peterson, L.C. 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**, 105-12 (2010).
16. Bowles, J., Schepers, G. & Koopman, P. Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev Biol* **227**, 239-55 (2000).



17. Dy, P. *et al.* The three SoxC proteins--Sox4, Sox11 and Sox12--exhibit overlapping expression patterns and molecular properties. *Nucleic Acids Res* **36**, 3101-17 (2008).
18. Duckworth, A., Glenn, M., Slupsky, J.R., Packham, G. & Kalakonda, N. Variable induction of PRDM1 and differentiation in chronic lymphocytic leukemia is associated with anergy. *Blood* **123**, 3277-85 (2014).
19. Chaplin, D.D. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol* **125**, S3-23 (2010).
20. Bonilla, F.A. & Oettgen, H.C. Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol* **125**, S33-S40 (2010).
21. Flajnik, M.F. & Kasahara, M. Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. *Nat Rev Genet.* **11**, 47-59 (2010).
22. Brewer, J.W. & Hendershot, L.M. Building an antibody factory: a job for the unfolded protein response. *Nat Immunol* **6**, 23-29 (2005).
23. Moore, M.A. & Metcalf, D. Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. *Br J Haematol* **18**, 279-296 (1970).
24. Muller, A.M., Medvinsky, A., Strouboulis, J., Grosveld, F. & Dzierzak, E. Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. *Immunity* **1**, 291-301 (1994).
25. Godin, I., Eterlen-Lievre, F. & Cumano, A. Emergence of multipotent hemopoietic cells in the yolk sac and paraaortic splanchnopleura in mouse embryos, beginning at 8.5 days postcoitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 773-777 (1995).
26. Wilson, A. & Trumpp, A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol* **6**, 93-106 (2006).
27. Coupland, S.E. The challenge of the microenvironment in B-cell lymphomas. *Blood* **58**, 69-80 (2011).
28. Siminovitch, L., McCulloch, E.A. & Till, J.E. THE DISTRIBUTION OF COLONY-FORMING CELLS AMONG SPLEEN COLONIES. *J Cell Physiol* **62**, 327-336 (1963).
29. Wu, A.M., Till, J.E., Siminovitch, L. & McCulloch, E.A. A cytological study of the capacity for differentiation of normal hemopoietic colony-forming cells. *J Cell Physiol* **69**, 177-184 (1967).
30. Domen, J. & Weissman, I.L. Self-renewal, differentiation or death: regulation and manipulation of hematopoietic stem cell fate. *Mol Med Today* **5**, 201-208 (1999).
31. Adolfsson, J. *et al.* Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythromegakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* **121**, 295-306 (2005).
32. Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T. & Weissman, I.L. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* **404**, 193-197 (2000).

33. Medina, K.L. *et al.* Identification of very early lymphoid precursors in bone marrow and their regulation by estrogen. *Nat Immunol* **2**, 718-724 (2001).
34. Igarashi, H., Gregory, S.C., Yokota, T., Sakaguchi, N. & Kincade, P.W. Transcription from the RAG1 locus marks the earliest lymphocyte progenitors in bone marrow. *Immunity* **17**, 117-130 (2002).
35. Schatz, D.G. & Spanopoulou, E. Biochemistry of V(D)J recombination. *Curr Top.Microbiol.Immunol* **290**, 49-85 (2005).
36. Allman, D. *et al.* Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors. *Nat Immunol* **4**, 168-174 (2003).
37. Kondo, M., Weissman, I.L. & Akashi, K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* **91**, 661-672 (1997).
38. Matthias, P. & Rolink, A.G. Transcriptional networks in developing and mature B cells. *Nat Rev Immunol* **5**, 497-508 (2005).
39. Fog, C.K., Galli, G.G. & Lund, A.H. PRDM proteins: important players in differentiation and disease. *Bioessays* **34**, 50-60 (2012).
40. Martinez-Climent, J.A., Fontan, L., Gascoyne, R.D., Siebert, R. & Prosper, F. Lymphoma stem cells: enough evidence to support their existence? *Haematologica* **95**, 293-302 (2010).
41. Koyama, M. *et al.* CD79 alpha/CD79 beta heterodimers are expressed on pro-B cell surfaces without associated mu heavy chain. *Int Immunol* **9**, 1767-1772 (1997).
42. Nagata, K. *et al.* The Ig alpha/Igbeta heterodimer on mu-negative proB cells is competent for transducing signals to induce early B cell differentiation. *Immunity* **7**, 559-570 (1997).
43. Alt, F.W. *et al.* Ordered rearrangement of immunoglobulin heavy chain variable region segments. *EMBO J* **3**, 1209-1219 (1984).
44. Ehlich, A., Martin, V., Muller, W. & Rajewsky, K. Analysis of the B-cell progenitor compartment at the level of single cells. *Curr Biol* **4**, 573-583 (1994).
45. ten, B.E., Melchers, F. & Rolink, A. The status of Ig loci rearrangements in single cells from different stages of B cell development. *Int Immunol* **7**, 1013-1019 (1995).
46. Meffre, E., Casellas, R. & Nussenzweig, M.C. Antibody regulation of B cell development. *Nat Immunol* **1**, 379-385 (2000).
47. Edry, E. & Melamed, D. Receptor editing in positive and negative selection of B lymphopoiesis. *J Immunol* **173**, 4265-71 (2004).
48. Pillai, S. & Baltimore, D. Formation of disulphide-linked mu 2 omega 2 tetramers in pre-B cells by the 18K omega-immunoglobulin light chain. *Nature* **329**, 172-174 (1987).
49. Kerr, W.G., Cooper, M.D., Feng, L., Burrows, P.D. & Hendershot, L.M. Mu heavy chains can associate with a pseudo-light chain complex (psi L) in human pre-B cell lines. *Int Immunol* **1**, 355-361 (1989).

50. Karasuyama, H., Kudo, A. & Melchers, F. The proteins encoded by the VpreB and lambda 5 pre-B cell-specific genes can associate with each other and with mu heavy chain. *J Exp Med* **172**, 969-972 (1990).
51. Tsubata, T. & Reth, M. The products of pre-B cell-specific genes (lambda 5 and VpreB) and the immunoglobulin mu chain form a complex that is transported onto the cell surface. *J Exp Med* **172**, 973-976 (1990).
52. Nussenzweig, M.C. *et al.* Allelic exclusion in transgenic mice that express the membrane form of immunoglobulin mu. *Science* **236**, 816-819 (1987).
53. Weaver, D., Costantini, F., Imanishi-Kari, T. & Baltimore, D. A transgenic immunoglobulin mu gene prevents rearrangement of endogenous genes. *Cell* **42**, 117-127 (1985).
54. Costa, T.E., Suh, H. & Nussenzweig, M.C. Chromosomal position of rearranging gene segments influences allelic exclusion in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 2205-2208 (1992).
55. Rusconi, S. & Kohler, G. Transmission and expression of a specific pair of rearranged immunoglobulin mu and kappa genes in a transgenic mouse line. *Nature* **314**, 330-334 (1985).
56. Schlissel, M.S. & Baltimore, D. Activation of immunoglobulin kappa gene rearrangement correlates with induction of germline kappa gene transcription. *Cell* **58**, 1001-1007 (1989).
57. Eisen, H.N. & Reilly, E.B. Lambda chains and genes in inbred mice. *Annu Rev Immunol* **3**, 337-365 (1985).
58. Yancopoulos, G.D. & Alt, F.W. Regulation of the assembly and expression of variable-region genes. *Annu Rev Immunol* **4**, 339-368 (1986).
59. Rimm, I.J., Bloch, D.B. & Seidman, J.G. Allelic exclusion and lymphocyte development. Lessons from transgenic mice. *Mol Biol Med* **6**, 355-364 (1989).
60. Reth, M., Wienands, J. & Schamel, W.W. An unsolved problem of the clonal selection theory and the model of an oligomeric B-cell antigen receptor. *Immunol Rev* **176**, 10-18 (2000).
61. Rolink, A.G., Schaniel, C., Andersson, J. & Melchers, F. Selection events operating at various stages in B cell development. *Curr Opin Immunol* **13**, 202-207 (2001).
62. Nemazee, D. Receptor selection in B and T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* **18**, 19-51 (2000).
63. MacLennan, I.C. Germinal centers. *Annu Rev Immunol* **12**, 117-139 (1994).
64. Batista, F.D. & Harwood, N.E. The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat Rev Immunol* **9**, 15-27 (2009).
65. Kerfoot, S.M. *et al.* Germinal center B cell and T follicular helper cell development initiates in the interfollicular zone. *Immunity* **34**, 947-960 (2011).
66. Okada, T. *et al.* Antigen-engaged B cells undergo chemotaxis toward the T zone and form motile conjugates with helper T cells. *PLoS Biol* **3**, e150 (2005).

67. Taylor, J.J., Pape, K.A. & Jenkins, M.K. A germinal center-independent pathway generates unswitched memory B cells early in the primary response. *J Exp Med* **209**, 597-606 (2012).
68. Dal Porto, J.M., Haberman, A.M., Kelsoe, G. & Shlomchik, M.J. Very low affinity B cells form germinal centers, become memory B cells, and participate in secondary immune responses when higher affinity competition is reduced. *J Exp Med* **195**, 1215-1221 (2002).
69. Victora, G.D. & Nussenzweig, M.C. Germinal centers. *Annu Rev Immunol* **30**, 429-457 (2012).
70. Bannard, O. *et al.* Germinal center centroblasts transition to a centrocyte phenotype according to a timed program and depend on the dark zone for effective selection. *Immunity* **39**, 912-924 (2013).
71. Allen, C.D. *et al.* Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nat Immunol* **5**, 943-952 (2004).
72. De Silva, N.S. & Klein, U. Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat Rev Immunol* **15**, 137-148 (2015).
73. Papavasiliou, F.N. & Schatz, D.G. Cell-cycle-regulated DNA double-stranded breaks in somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *Nature* **408**, 216-221 (2000).
74. Goossens, T., Klein, U. & Kuppers, R. Frequent occurrence of deletions and duplications during somatic hypermutation: implications for oncogene translocations and heavy chain disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2463-2468 (1998).
75. Kuppers, R., Klein, U., Hansmann, M.L. & Rajewsky, K. Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med* **341**, 1520-9 (1999).
76. Zhang, Y. *et al.* Germinal center B cells govern their own fate via antibody feedback. *J Exp Med* **210**, 457-464 (2013).
77. Victora, G.D. *et al.* Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell* **143**, 592-605 (2010).
78. Liu, Y.J. *et al.* Within germinal centers, isotype switching of immunoglobulin genes occurs after the onset of somatic mutation. *Immunity* **4**, 241-250 (1996).
79. Rooney, S., Chaudhuri, J. & Alt, F.W. The role of the non-homologous end-joining pathway in lymphocyte development. *Immunol Rev* **200**, 115-131 (2004).
80. Kracker, S. & Durandy, A. Insights into the B cell specific process of immunoglobulin class switch recombination. *Immunol Lett.* **138**, 97-103 (2011).
81. Klein, U. & la-Favera, R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol* **8**, 22-33 (2008).
82. Phan, T.G. *et al.* High affinity germinal center B cells are actively selected into the plasma cell compartment. *J Exp Med* **203**, 2419-2424 (2006).
83. Cobaleda, C., Schebesta, A., Delogu, A. & Busslinger, M. Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nat Immunol* **8**, 463-470 (2007).

84. Kallies, A. *et al.* Initiation of plasma-cell differentiation is independent of the transcription factor Blimp-1. *Immunity* **26**, 555-566 (2007).
85. Cattoretti, G. *et al.* BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells. *Blood* **86**, 45-53 (1995).
86. Dent, A.L., Shaffer, A.L., Yu, X., Allman, D. & Staudt, L.M. Control of inflammation, cytokine expression, and germinal center formation by BCL-6. *Science* **276**, 589-592 (1997).
87. Lin, L., Gerth, A.J. & Peng, S.L. Active inhibition of plasma cell development in resting B cells by microphthalmia-associated transcription factor. *J Exp Med* **200**, 115-22 (2004).
88. Turner, C.A., Jr., Mack, D.H. & Davis, M.M. Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells. *Cell* **77**, 297-306 (1994).
89. Reimold, A.M. *et al.* Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature* **412**, 300-307 (2001).
90. Shaffer, A.L. *et al.* XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity* **21**, 81-93 (2004).
91. Klein, U. *et al.* Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. *Nat Immunol* **7**, 773-782 (2006).
92. Sciammas, R. *et al.* Graded expression of interferon regulatory factor-4 coordinates isotype switching with plasma cell differentiation. *Immunity* **25**, 225-236 (2006).
93. Mittrucker, H.W. *et al.* Requirement for the transcription factor LSIRF/IRF4 for mature B and T lymphocyte function. *Science* **275**, 540-543 (1997).
94. Shapiro-Shelef, M., Lin, K.I., Savitsky, D., Liao, J. & Calame, K. Blimp-1 is required for maintenance of long-lived plasma cells in the bone marrow. *J Exp Med* **202**, 1471-1476 (2005).
95. Scheeren, F.A. *et al.* STAT5 regulates the self-renewal capacity and differentiation of human memory B cells and controls Bcl-6 expression. *Nat Immunol* **6**, 303-313 (2005).
96. Reljic, R., Wagner, S.D., Peakman, L.J. & Fearon, D.T. Suppression of signal transducer and activator of transcription 3-dependent B lymphocyte terminal differentiation by BCL-6. *J Exp Med* **192**, 1841-1848 (2000).
97. Toyama, H. *et al.* Memory B cells without somatic hypermutation are generated from Bcl6-deficient B cells. *Immunity* **17**, 329-339 (2002).
98. Kuo, T.C. *et al.* Repression of BCL-6 is required for the formation of human memory B cells in vitro. *J Exp Med* **204**, 819-830 (2007).
99. Arpin, C. *et al.* Generation of memory B cells and plasma cells in vitro. *Science* **268**, 720-722 (1995).

100. Mock, B.A., Liu, L., LePaslier, D. & Huang, S. The B-lymphocyte maturation promoting transcription factor BLIMP1/PRDI-BF1 maps to D6S447 on human chromosome 6q21-q22.1 and the syntenic region of mouse chromosome 10. *Genomics* **37**, 24-28 (1996).
101. Keller, A.D. & Maniatis, T. Only two of the five zinc fingers of the eukaryotic transcriptional repressor PRDI-BF1 are required for sequence-specific DNA binding. *Mol Cell Biol* **12**, 1940-1949 (1992).
102. Fumasoni, I. *et al.* Family expansion and gene rearrangements contributed to the functional specialization of PRDM genes in vertebrates. *BMC.Evol.Biol* **7**, 187 (2007).
103. Schmidt, D. *et al.* Blimp-1Deltaexon7: a naturally occurring Blimp-1 deletion mutant with auto-regulatory potential. *Exp Cell Res* **314**, 3614-3627 (2008).
104. Gyory, I., Fejer, G., Ghosh, N., Seto, E. & Wright, K.L. Identification of a functionally impaired positive regulatory domain I binding factor 1 transcription repressor in myeloma cell lines. *J Immunol* **170**, 3125-3133 (2003).
105. Calame, K.L., Lin, K.I. & Tunyaplin, C. Regulatory mechanisms that determine the development and function of plasma cells. *Annu Rev Immunol* **21**, 205-230 (2003).
106. Shapiro-Shelef, M. *et al.* Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells. *Immunity* **19**, 607-620 (2003).
107. Tunyaplin, C., Shapiro, M.A. & Calame, K.L. Characterization of the B lymphocyte-induced maturation protein-1 (Blimp-1) gene, mRNA isoforms and basal promoter. *Nucleic Acids Res* **28**, 4846-4855 (2000).
108. Ocana, E. *et al.* The expression of PRDI-BF1 beta isoform in multiple myeloma plasma cells. *Haematologica* **91**, 1579-1580 (2006).
109. Chadwick, R.B. *et al.* Candidate tumor suppressor RIZ is frequently involved in colorectal carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2662-2667 (2000).
110. Ronni, T. *et al.* Human Ikaros function in activated T cells is regulated by coordinated expression of its largest isoforms. *J Biol Chem* **282**, 2538-2547 (2007).
111. Sun, L. *et al.* Expression of aberrantly spliced oncogenic ikaros isoforms in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* **17**, 3753-3766 (1999).
112. Shao, H. *et al.* KRAB-containing zinc finger gene ZNF268 encodes multiple alternatively spliced isoforms that contain transcription regulatory domains. *Int J Mol Med* **18**, 457-463 (2006).
113. John, S.A. & Garrett-Sinha, L.A. Blimp1: a conserved transcriptional repressor critical for differentiation of many tissues. *Exp Cell Res* **315**, 1077-84 (2009).
114. Martins, G.A. *et al.* Transcriptional repressor Blimp-1 regulates T cell homeostasis and function. *Nat Immunol* **7**, 457-465 (2006).
115. Chang, D.H., ngelin-Duclos, C. & Calame, K. BLIMP-1: trigger for differentiation of myeloid lineage. *Nat Immunol* **1**, 169-176 (2000).

116. Ren, B., Chee, K.J., Kim, T.H. & Maniatis, T. PRDI-BF1/Blimp-1 repression is mediated by corepressors of the Groucho family of proteins. *Genes Dev* **13**, 125-137 (1999).
117. Gyory, I., Wu, J., Fejer, G., Seto, E. & Wright, K.L. PRDI-BF1 recruits the histone H3 methyltransferase G9a in transcriptional silencing. *Nat Immunol* **5**, 299-308 (2004).
118. Yu, J., ngelin-Duclos, C., Greenwood, J., Liao, J. & Calame, K. Transcriptional repression by blimp-1 (PRDI-BF1) involves recruitment of histone deacetylase. *Mol Cell Biol* **20**, 2592-2603 (2000).
119. Shi, Y. *et al.* Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* **119**, 941-953 (2004).
120. Su, S.T. *et al.* Involvement of histone demethylase LSD1 in Blimp-1-mediated gene repression during plasma cell differentiation. *Mol Cell Biol* **29**, 1421-1431 (2009).
121. Shaffer, A.L. *et al.* Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity* **17**, 51-62 (2002).
122. Manis, J.P. *et al.* Ku70 is required for late B cell development and immunoglobulin heavy chain class switching. *J Exp Med* **187**, 2081-2089 (1998).
123. Muramatsu, M. *et al.* Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* **102**, 553-563 (2000).
124. Piskurich, J.F. *et al.* BLIMP-1 mediates extinction of major histocompatibility class II transactivator expression in plasma cells. *Nat Immunol* **1**, 526-532 (2000).
125. Silacci, P., Mottet, A., Steimle, V., Reith, W. & Mach, B. Developmental extinction of major histocompatibility complex class II gene expression in plasmocytes is mediated by silencing of the transactivator gene CIITA. *J Exp Med* **180**, 1329-1336 (1994).
126. Lin, Y., Wong, K. & Calame, K. Repression of c-myc transcription by Blimp-1, an inducer of terminal B cell differentiation. *Science* **276**, 596-599 (1997).
127. Collier, H.A. *et al.* Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3260-3265 (2000).
128. Lin, K.I., Lin, Y. & Calame, K. Repression of c-myc is necessary but not sufficient for terminal differentiation of B lymphocytes in vitro. *Mol Cell Biol* **20**, 8684-8695 (2000).
129. Sciammas, R. & Davis, M.M. Modular nature of Blimp-1 in the regulation of gene expression during B cell maturation. *J Immunol* **172**, 5427-5440 (2004).
130. Lin, K.I., ngelin-Duclos, C., Kuo, T.C. & Calame, K. Blimp-1-dependent repression of Pax-5 is required for differentiation of B cells to immunoglobulin M-secreting plasma cells. *Mol Cell Biol* **22**, 4771-4780 (2002).

131. Rinkenberger, J.L., Wallin, J.J., Johnson, K.W. & Koshland, M.E. An interleukin-2 signal relieves BSAP (Pax5)-mediated repression of the immunoglobulin J chain gene. *Immunity* **5**, 377-386 (1996).
132. Singh, M. & Birshstein, B.K. NF-HB (BSAP) is a repressor of the murine immunoglobulin heavy-chain 3' alpha enhancer at early stages of B-cell differentiation. *Mol Cell Biol* **13**, 3611-3622 (1993).
133. Kabashima, K. *et al.* Plasma cell S1P1 expression determines secondary lymphoid organ retention versus bone marrow tropism. *J Exp Med* **203**, 2683-2690 (2006).
134. Hanahan, D. & Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70 (2000).
135. Swerdlow, S.H. *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues* (Lyon, International Agency for Research on Cancer), (2008).
136. Swerdlow, S.H. *et al.* The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. **127**, 2375-90 (2016).
137. Staudt, L.M. Oncogenic activation of NF-kappaB. *Cold Spring Harb.Perspect.Biol* **2**, a000109 (2010).
138. Srinivasan, L. *et al.* PI3 kinase signals BCR-dependent mature B cell survival. *Cell* **139**, 573-586 (2009).
139. Meier, C. *et al.* Recurrent numerical aberrations of JAK2 and deregulation of the JAK2-STAT cascade in lymphomas. *Mod.Pathol* **22**, 476-487 (2009).
140. Shaffer, A.L. *et al.* A library of gene expression signatures to illuminate normal and pathological lymphoid biology. *Immunol Rev* **210**, 67-85 (2006).
141. Basso, K. & la-Favera, R. BCL6: master regulator of the germinal center reaction and key oncogene in B cell lymphomagenesis. *Adv Immunol* **105**, 193-210 (2010).
142. Mandelbaum, J. *et al.* BLIMP1 is a tumor suppressor gene frequently disrupted in activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell* **18**, 568-579 (2010).
143. Shaffer, A.L., Emre, N.C., Romesser, P.B. & Staudt, L.M. IRF4: Immunity. Malignancy! Therapy? *Clin Cancer Res* **15**, 2954-2961 (2009).
144. Alberghini, F., Petrocelli, V., Rahmat, M. & Casola, S. An epigenetic view of B-cell disorders. *Immunol Cell Biol* **93**, 253-260 (2015).
145. Musilova, K. & Mraz, M. MicroRNAs in B-cell lymphomas: how a complex biology gets more complex. *Leukemia* **29**, 1004-1017 (2015).
146. Chi, P., Allis, C.D. & Wang, G.G. Covalent histone modifications--miswritten, misinterpreted and mis-erased in human cancers. *Nat Rev Cancer* **10**, 457-469 (2010).
147. Steidl, C. *et al.* MHC class II transactivator CIITA is a recurrent gene fusion partner in lymphoid cancers. *Nature* **471**, 377-381 (2011).



148. Ek, S. *et al.* From gene expression analysis to tissue microarrays: a rational approach to identify therapeutic and diagnostic targets in lymphoid malignancies. *Mol Cell Proteomics* **5**, 1072-1081 (2006).
149. Leich, E., Hartmann, E.M., Burek, C., Ott, G. & Rosenwald, A. Diagnostic and prognostic significance of gene expression profiling in lymphomas. *APMIS* **115**, 1135-1146 (2007).
150. Damle, R.N. *et al.* Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **94**, 1840-1847 (1999).
151. Hamblin, T.J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D.G. & Stevenson, F.K. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **94**, 1848-1854 (1999).
152. Rosenwald, A. *et al.* Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* **194**, 1639-1647 (2001).
153. Alizadeh, A.A. *et al.* Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* **403**, 503-511 (2000).
154. Wright, G. *et al.* A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 9991-9996 (2003).
155. Dave, S.S. *et al.* Molecular diagnosis of Burkitt's lymphoma. *N Engl J Med* **354**, 2431-2442 (2006).
156. Klein, U. *et al.* Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med* **194**, 1625-1638 (2001).
157. Isaacson, P.G. & Du, M.Q. MALT lymphoma: from morphology to molecules. *Nat Rev Cancer* **4**, 644-653 (2004).
158. Basso, K. *et al.* Gene expression profiling of hairy cell leukemia reveals a phenotype related to memory B cells with altered expression of chemokine and adhesion receptors. *J Exp Med* **199**, 59-68 (2004).
159. Isaacson, P.G., Norton, A.J. & Addis, B.J. The human thymus contains a novel population of B lymphocytes. *Lancet* **2**, 1488-1491 (1987).
160. Shaffer, A.L., 3rd, Young, R.M. & Staudt, L.M. Pathogenesis of human B cell lymphomas. *Annu Rev Immunol* **30**, 565-610 (2012).
161. Kolar, G.R., Mehta, D., Pelayo, R. & Capra, J.D. A novel human B cell subpopulation representing the initial germinal center population to express AID. *Blood* **109**, 2545-52 (2007).
162. Sims, G.P. *et al.* Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood* **105**, 4390-8 (2005).
163. Jares, P., Colomer, D. & Campo, E. Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma. *J Clin Invest* **122**, 3416-23 (2012).

164. Jares, P., Colomer, D. & Campo, E. Genetic and molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: perspectives for new targeted therapeutics. *Nat Rev Cancer* **7**, 750-62 (2007).
165. Jares, P. & Campo, E. Advances in the understanding of mantle cell lymphoma. *Br J Haematol* **142**, 149-65 (2008).
166. Campo, E., Raffeld, M. & Jaffe, E.S. Mantle-cell lymphoma. *Semin Hematol* **36**, 115-27 (1999).
167. Fu, K. *et al.* Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study based on gene expression profiling. *Blood* **106**, 4315-21 (2005).
168. Gesk, S. *et al.* A chromosomal translocation in cyclin D1-negative/cyclin D2-positive mantle cell lymphoma fuses the CCND2 gene to the IGK locus. *Blood* **108**, 1109-10 (2006).
169. Salaverria, I. *et al.* CCND2 rearrangements are the most frequent genetic events in cyclin D1(-) mantle cell lymphoma. *Blood* **121**, 1394-402 (2013).
170. Bea, S. *et al.* Landscape of somatic mutations and clonal evolution in mantle cell lymphoma. *Blood* **110**, 18250-5 (2013).
171. Kiefer, J.C. Back to basics: Sox genes. *Dev Dyn* **236**, 2356-66 (2007).
172. van de Wetering, M., Oosterwegel, M., van Norren, K. & Clevers, H. Sox-4, an Sry-like HMG box protein, is a transcriptional activator in lymphocytes. *Embo j* **12**, 3847-54 (1993).
173. Jay, P. *et al.* The human SOX11 gene: cloning, chromosomal assignment and tissue expression. *Genomics* **29**, 541-5 (1995).
174. Jay, P. *et al.* SOX22 is a new member of the SOX gene family, mainly expressed in human nervous tissue. *Hum Mol Genet* **6**, 1069-77 (1997).
175. Penzo-Mendez, A.I. Critical roles for SoxC transcription factors in development and cancer. *Int J Biochem Cell Biol* **42**, 425-8 (2010).
176. Palomero, J. *et al.* SOX11 promotes tumor angiogenesis through transcriptional regulation of PDGFA in mantle cell lymphoma. **124**, 2235-47 (2014).
177. Inamdar, A.A. *et al.* Mantle cell lymphoma in the era of precision medicine-diagnosis, biomarkers and therapeutic agents. *Oncotarget* **7**, 48692-48731 (2016).
178. Dreyling, M., Ferrero, S. & Hermine, O. How to manage mantle cell lymphoma. *Leukemia* **28**, 2117-30 (2014).
179. Bernard, M. *et al.* Limited-stage mantle cell lymphoma: treatment outcomes at the Princess Margaret Hospital. *Leuk Lymphoma* **54**, 261-7 (2013).
180. Guru Murthy, G.S., Venkitachalam, R. & Mehta, P. Effect of radiotherapy on the survival of patients with stage I and stage II mantle cell lymphoma: analysis of the Surveillance, Epidemiology and End Results database. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* **14 Suppl**, S90-5 (2014).

181. Cheah, C.Y. *et al.* Central nervous system involvement in mantle cell lymphoma: clinical features, prognostic factors and outcomes from the European Mantle Cell Lymphoma Network. *Ann Oncol* **24**, 2119-23 (2013).
182. Flinn, I.W. *et al.* Randomized trial of bendamustine-rituximab or R-CHOP/R-CVP in first-line treatment of indolent NHL or MCL: the BRIGHT study. *Blood* **123**, 2944-52 (2014).
183. Saito, H. *et al.* Prolonged lymphocytopenia after bendamustine therapy in patients with relapsed or refractory indolent B-cell and mantle cell lymphoma. *Blood Cancer J* **5**, e362 (2015).
184. McKay, P., Leach, M., Jackson, R., Cook, G. & Rule, S. Guidelines for the investigation and management of mantle cell lymphoma. *Br J Haematol* **159**, 405-26 (2012).
185. Rajguru, S. & Kahl, B.S. Emerging therapy for the treatment of mantle cell lymphoma. *J Natl Compr Canc Netw* **12**, 1311-8; quiz 1318 (2014).
186. Robak, T. *et al.* Bortezomib-based therapy for newly diagnosed mantle-cell lymphoma. *N Engl J Med* **372**, 944-53 (2015).
187. Romaguera, J.E. *et al.* 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**, 200-8 (2010).
188. Tam, C.S. *et al.* Mature results of the M. D. Anderson Cancer Center risk-adapted transplantation strategy in mantle cell lymphoma. *Blood* **113**, 4144-52 (2009).
189. Griffin, M.M. & Morley, N. Rituximab in the treatment of non-Hodgkin's lymphoma--a critical evaluation of randomized controlled trials. *Expert Opin Biol Ther* **13**, 803-11 (2013).
190. Gunnellini, M. & Falchi, L. Therapeutic Activity of Lenalidomide in Mantle Cell Lymphoma and Indolent Non-Hodgkin's Lymphomas. *Adv Hematol* **2012**, 523842 (2012).
191. Ruan, J. *et al.* Lenalidomide plus Rituximab as Initial Treatment for Mantle-Cell Lymphoma. *N Engl J Med* **373**, 1835-44 (2015).
192. Fisher, R.I. *et al.* Multicenter phase II study of bortezomib in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol* **24**, 4867-74 (2006).
193. Hess, G. *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* **27**, 3822-9 (2009).
194. Trneny, M. *et al.* Lenalidomide versus investigator's choice in relapsed or refractory mantle cell lymphoma (MCL-002; SPRINT): a phase 2, randomised, multicentre trial. *Lancet Oncol* **17**, 319-31 (2016).
195. Goy, A. *et al.* Single-agent lenalidomide in patients with mantle-cell lymphoma who relapsed or progressed after or were refractory to bortezomib: phase II MCL-001 (EMERGE) study. *J Clin Oncol* **31**, 3688-95 (2013).

196. Wang, M.L. *et al.* Targeting BTK with ibrutinib in relapsed or refractory mantle-cell lymphoma. *N Engl J Med* **369**, 507-16 (2013).
197. Wang, M. *et al.* Lenalidomide in combination with rituximab for patients with relapsed or refractory mantle-cell lymphoma: a phase 1/2 clinical trial. *Lancet Oncol* **13**, 716-23 (2012).
198. Wang, M.L. *et al.* Ibrutinib in combination with rituximab in relapsed or refractory mantle cell lymphoma: a single-centre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* **17**, 48-56 (2016).
199. Chiorazzi, N., Rai, K.R. & Ferrarini, M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* **352**, 804-815 (2005).
200. Hallek, M. *et al.* Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* **111**, 5446-5456 (2008).
201. Hallek, M. Chronic lymphocytic leukemia: 2013 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am J Hematol* **88**, 803-816 (2013).
202. Zwiebel, J.A. & Cheson, B.D. Chronic lymphocytic leukemia: staging and prognostic factors. *Semin Oncol* **25**, 42-59 (1998).
203. Watson, L., Wyld, P. & Catovsky, D. Disease burden of chronic lymphocytic leukaemia within the European Union. *Eur.J Haematol* **81**, 253-258 (2008).
204. Dighiero, G. & Hamblin, T.J. Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* **371**, 1017-1029 (2008).
205. Matutes, E. *et al.* FISH analysis for BCL-1 rearrangements and trisomy 12 helps the diagnosis of atypical B cell leukaemias. *Leukemia* **13**, 1721-1726 (1999).
206. Wierda, W.G. *et al.* Prognostic nomogram and index for overall survival in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **109**, 4679-4685 (2007).
207. Dighiero, G. & Binet, J.L. When and how to treat chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* **343**, 1799-1801 (2000).
208. Giles, F.J., O'Brien, S.M. & Keating, M.J. Chronic lymphocytic leukemia in (Richter's) transformation. *Semin Oncol* **25**, 117-125 (1998).
209. Hercher, C. *et al.* A multicentric study of 41 cases of B-prolymphocytic leukemia: two evolutive forms. *Leuk Lymphoma* **42**, 981-987 (2001).
210. Lens, D. *et al.* B cell prolymphocytic leukaemia (B-PLL) with complex karyotype and concurrent abnormalities of the p53 and c-MYC gene. *Leukemia* **13**, 873-876 (1999).
211. Kujawski, L. *et al.* Genomic complexity identifies patients with aggressive chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **112**, 1993-2003 (2008).
212. Ouillette, P. *et al.* Acquired genomic copy number aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **118**, 3051-3061 (2011).
213. Gunnarsson, R. *et al.* Large but not small copy-number alterations correlate to high-risk genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia: a high-resolution genomic screening of newly diagnosed patients. *Leukemia* **24**, 211-215 (2010).

214. Ritgen, M. *et al.* Unmutated immunoglobulin variable heavy-chain gene status remains an adverse prognostic factor after autologous stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **101**, 2049-2053 (2003).
215. Smit, L.A. *et al.* Antigen receptors and somatic hypermutation in B-cell chronic lymphocytic leukemia with Richter's transformation. *Haematologica* **91**, 903-911 (2006).
216. Dohner, H. *et al.* Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* **343**, 1910-1916 (2000).
217. Mayr, C. *et al.* Chromosomal translocations are associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **107**, 742-751 (2006).
218. Krober, A. *et al.* V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **100**, 1410-1416 (2002).
219. Montillo, M., Hamblin, T., Hallek, M., Montserrat, E. & Morra, E. Chronic lymphocytic leukemia: novel prognostic factors and their relevance for risk-adapted therapeutic strategies. *Haematologica* **90**, 391-399 (2005).
220. Wiestner, A. *et al.* ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood* **101**, 4944-4951 (2003).
221. Rassenti, L.Z. *et al.* ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* **351**, 893-901 (2004).
222. Puente, X.S. *et al.* Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* **475**, 101-105 (2011).
223. Fabbri, G. *et al.* Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *J Exp Med* **208**, 1389-1401 (2011).
224. Villamor, N. *et al.* NOTCH1 mutations identify a genetic subgroup of chronic lymphocytic leukemia patients with high risk of transformation and poor outcome. *Leukemia* **27**, 1100-1106 (2013).
225. Wang, L. *et al.* SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* **365**, 2497-2506 (2011).
226. Quesada, V. *et al.* Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet.* **44**, 47-52 (2012).
227. Rossi, D. *et al.* Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **119**, 2854-2862 (2012).
228. Migliazza, A. *et al.* Nucleotide sequence, transcription map, and mutation analysis of the 13q14 chromosomal region deleted in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **97**, 2098-2104 (2001).

229. Calin, G.A. *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* **99**, 15524-15529 (2002).
230. Calin, G.A. *et al.* MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 11755-11760 (2004).
231. Cimmino, A. *et al.* miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 13944-13949 (2005).
232. Calin, G.A. *et al.* A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* **353**, 1793-1801 (2005).
233. Zhang, J. *et al.* Patterns of microRNA expression characterize stages of human B-cell differentiation. *Blood* **113**, 4586-4594 (2009).
234. Lyko, F. *et al.* Quantitative analysis of DNA methylation in chronic lymphocytic leukemia patients. *Electrophoresis* **25**, 1530-1535 (2004).
235. Rahmatpanah, F.B. *et al.* Large-scale analysis of DNA methylation in chronic lymphocytic leukemia. *Epigenomics*. **1**, 39-61 (2009).
236. Hanada, M., Delia, D., Aiello, A., Stadtmauer, E. & Reed, J.C. bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **82**, 1820-1828 (1993).
237. Yuille, M.R. *et al.* TCL1 is activated by chromosomal rearrangement or by hypomethylation. *Genes Chromosomes.Cancer* **30**, 336-341 (2001).
238. Lipsanen, V., Leinonen, P., Alhonen, L. & Janne, J. Hypomethylation of ornithine decarboxylase gene and erb-A1 oncogene in human chronic lymphatic leukemia. *Blood* **72**, 2042-2044 (1988).
239. Yu, M.K., Bergonia, H., Szabo, A. & Phillips, J.D. Progressive disease in chronic lymphocytic leukemia is correlated with the DNA methylation index. *Leuk Res* **31**, 773-777 (2007).
240. Kanduri, M. *et al.* Differential genome-wide array-based methylation profiles in prognostic subsets of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **115**, 296-305 (2010).
241. Kulis, M. *et al.* Epigenomic analysis detects widespread gene-body DNA hypomethylation in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet.* **44**, 1236-1242 (2012).
242. Eichhorst, B. *et al.* appendix 6: Chronic lymphocytic leukaemia: eUpdate published online September 2016 (<http://www.esmo.org/Guidelines/Haematological-Malignancies>). *Ann Oncol* **27**, v143-v144 (2016).
243. Eichhorst, B. *et al.* Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* **26 Suppl 5**, v78-84 (2015).
244. Robak, T. Therapy of chronic lymphocytic leukaemia with purine nucleoside analogues: facts and controversies. *Drugs Aging* **22**, 983-1012 (2005).

245. Chang, J.E. & Kahl, B.S. Bendamustine for treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Expert Opin Pharmacother* **13**, 1495-505 (2012).
246. Lukenbill, J. & Kalaycio, M. Fludarabine: a review of the clear benefits and potential harms. *Leuk Res* **37**, 986-94 (2013).
247. Hallek, M. *et al.* Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* **376**, 1164-74 (2010).
248. Goede, V. *et al.* Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. *N Engl J Med* **370**, 1101-10 (2014).
249. Hillmen, P. *et al.* Chlorambucil plus ofatumumab versus chlorambucil alone in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukaemia (COMPLEMENT 1): a randomised, multicentre, open-label phase 3 trial. *Lancet* **385**, 1873-83 (2015).
250. Wierda, W.G. *et al.* Ofatumumab as single-agent CD20 immunotherapy in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* **28**, 1749-55 (2010).
251. Fischer, K. *et al.* Long-term remissions after FCR chemoimmunotherapy in previously untreated patients with CLL: updated results of the CLL8 trial. *Blood* **127**, 208-15 (2016).
252. Rossi, D. *et al.* Molecular prediction of durable remission after first-line fludarabine-cyclophosphamide-rituximab in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **126**, 1921-4 (2015).
253. Thompson, P.A. *et al.* Fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab treatment achieves long-term disease-free survival in IGHV-mutated chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **127**, 303-9 (2016).
254. O'Neill, S.K. *et al.* Monophosphorylation of CD79a and CD79b ITAM motifs initiates a SHIP-1 phosphatase-mediated inhibitory signaling cascade required for B cell anergy. *Immunity* **35**, 746-56 (2011).
255. Ponader, S. *et al.* The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 thwarts chronic lymphocytic leukemia cell survival and tissue homing in vitro and in vivo. *Blood* **119**, 1182-9 (2012).
256. Guo, A. *et al.* Heightened BTK-dependent cell proliferation in unmutated chronic lymphocytic leukemia confers increased sensitivity to ibrutinib. *N Engl J Med* **7**, 4598-610 (2016).
257. Byrd, J.C. *et al.* Ibrutinib versus ofatumumab in previously treated chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med* **371**, 213-23 (2014).
258. Burger, J.A. *et al.* Ibrutinib as Initial Therapy for Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood* **373**, 2425-37 (2015).
259. Byrd, J.C. *et al.* Acalabrutinib (ACP-196) in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* **374**, 323-32 (2016).
260. Walter, H.S., Rule, S.A. & Dyer, M.J. A phase 1 clinical trial of the selective BTK inhibitor ONO/GS-4059 in relapsed and refractory mature B-cell malignancies. **127**, 411-9 (2016).

261. Furman, R.R. *et al.* Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* **370**, 997-1007 (2014).
262. Del Gaizo Moore, V. *et al.* Chronic lymphocytic leukemia requires BCL2 to sequester prodeath BIM, explaining sensitivity to BCL2 antagonist ABT-737. *J Clin Invest* **117**, 112-21 (2007).
263. Roberts, A.W. *et al.* Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* **374**, 311-22 (2016).
264. Stilgenbauer, S. *et al.* Venetoclax in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion: a multicentre, open-label, phase 2 study. *Lancet Oncol* **17**, 768-78 (2016).
265. Gradowski, J.F. *et al.* Follicular lymphomas with plasmacytic differentiation include two subtypes. *Mod Pathol* **23**, 71-9 (2010).
266. Molina, T.J., Lin, P., Swerdlow, S.H. & Cook, J.R. Marginal zone lymphomas with plasmacytic differentiation and related disorders. *Am J Clin Pathol* **136**, 211-25 (2011).
267. Lin, P., Molina, T.J., Cook, J.R. & Swerdlow, S.H. Lymphoplasmacytic lymphoma and other non-marginal zone lymphomas with plasmacytic differentiation. *Am J Clin Pathol* **136**, 195-210 (2011).
268. Evans, H.L., Polski, J.M., Deshpande, V. & Dunphy, C.H. CD5+ true SLL/CLL with plasmacytic differentiation and an unusual 1p36 translocation: case report and review of the literature. *Leuk Lymphoma* **39**, 625-32 (2000).
269. George, T.I. *et al.* Low-grade B-Cell lymphomas with plasmacytic differentiation lack PAX5 gene rearrangements. *J Mol Diagn* **7**, 346-51 (2005).
270. Duong Van Huyen, J.P. *et al.* Splenic marginal zone lymphoma with or without plasmacytic differentiation. *Am J Surg Pathol* **24**, 1581-92 (2000).
271. Ruiz, A. *et al.* Extranodal marginal zone B-cell lymphomas of the ocular adnexa: multiparameter analysis of 34 cases including interphase molecular cytogenetics and PCR for *Chlamydia psittaci*. *Am J Surg Pathol* **31**, 792-802 (2007).
272. Perez-Galan, P. *et al.* Bortezomib resistance in mantle cell lymphoma is associated with plasmacytic differentiation. *Blood* **117**, 542-552 (2011).
273. Ribera-Cortada, I. *et al.* Plasma cell and terminal B-cell differentiation in mantle cell lymphoma mainly occur in the SOX11-negative subtype. *Mod Pathol* **28**, 1435-47 (2015).
274. Zeng, W. *et al.* Cyclin D1-negative blastoid mantle cell lymphoma identified by SOX11 expression. *Am J Surg Pathol* **36**, 214-9 (2012).
275. Pan, X. *et al.* Ubc9 interacts with SOX4 and represses its transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun* **344**, 727-34 (2006).
276. Gill, G. SUMO changes Sox for developmental diversity. *Mol Cell* **20**, 495-6 (2005).
277. Vegliante, M.C. *et al.* Epigenetic activation of SOX11 in lymphoid neoplasms by histone modifications. *PLoS One* **6**, e21382 (2011).



278. Amador, V., Ge, S., Santamaria, P.G., Guardavaccaro, D. & Pagano, M. APC/C(Cdc20) controls the ubiquitin-mediated degradation of p21 in prometaphase. *Mol Cell* **27**, 462-73 (2007).
279. Hummel, M. *et al.* A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling. *N Engl J Med* **354**, 2419-30 (2006).
280. Carvajal-Cuenca, A. *et al.* In situ mantle cell lymphoma: clinical implications of an incidental finding with indolent clinical behavior. *Haematologica* **97**, 270-8 (2012).
281. Nordstrom, L. *et al.* Expanded clinical and experimental use of SOX11 - using a monoclonal antibody. *BMC Cancer* **12**, 269 (2012).
282. Gutierrez, A., Jr. *et al.* Differentiation of chronic lymphocytic leukemia B cells into immunoglobulin secreting cells decreases LEF-1 expression. *PLoS One* **6**, e26056 (2011).
283. Swerdlow, S.H. *et al.* The many faces of small B cell lymphomas with plasmacytic differentiation and the contribution of MYD88 testing. *Virchows Arch* **468**, 259-75 (2016).
284. Tandon, B. *et al.* Nuclear overexpression of lymphoid-enhancer-binding factor 1 identifies chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma in small B-cell lymphomas. *Mod Pathol* **24**, 1433-43 (2011).
285. Zhao, W.L. *et al.* PRDM1 is involved in chemoresistance of T-cell lymphoma and down-regulated by the proteasome inhibitor. *Blood* **111**, 3867-71 (2008).
286. Gutierrez, N.C. *et al.* Gene expression profiling of B lymphocytes and plasma cells from Waldenstrom's macroglobulinemia: comparison with expression patterns of the same cell counterparts from chronic lymphocytic leukemia, multiple myeloma and normal individuals. *Leukemia* **21**, 541-9 (2007).
287. Jackson, A. *et al.* Deletion of 6q16-q21 in human lymphoid malignancies: a mapping and deletion analysis. *Cancer Res* **60**, 2775-9 (2000).
288. Thelander, E.F. *et al.* Characterization of 6q deletions in mature B cell lymphomas and childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* **49**, 477-87 (2008).
289. Pasqualucci, L. *et al.* Inactivation of the PRDM1/BLIMP1 gene in diffuse large B cell lymphoma. *J Exp Med* **203**, 311-317 (2006).
290. Tam, W. *et al.* Mutational analysis of PRDM1 indicates a tumor-suppressor role in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* **107**, 4090-4100 (2006).
291. Buggy, Y. *et al.* Overexpression of the Ets-1 transcription factor in human breast cancer. *Br J Cancer* **91**, 1308-15 (2004).
292. Ozaki, I. *et al.* Involvement of the Ets-1 gene in overexpression of matrilysin in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* **60**, 6519-25 (2000).
293. Davidson, B. *et al.* Ets-1 messenger RNA expression is a novel marker of poor survival in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* **7**, 551-7 (2001).

294. Mukherjee, T., Kumar, A., Mathur, M., Chattopadhyay, T.K. & Ralhan, R. Ets-1 and VEGF expression correlates with tumor angiogenesis, lymph node metastasis, and patient survival in esophageal squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* **129**, 430-6 (2003).
295. Rovigatti, U., Watson, D.K. & Yunis, J.J. Amplification and rearrangement of Hu-ets-1 in leukemia and lymphoma with involvement of 11q23. *Science* **232**, 398-400 (1986).
296. Bonetti, P. *et al.* Deregulation of ETS1 and FLI1 contributes to the pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* **122**, 2233-41 (2013).
297. Pasqualucci, L. *et al.* Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nat Genet* **43**, 830-7 (2011).
298. John, S.A., Clements, J.L., Russell, L.M. & Garrett-Sinha, L.A. Ets-1 regulates plasma cell differentiation by interfering with the activity of the transcription factor Blimp-1. *J Biol Chem* **283**, 951-62 (2008).
299. Ghamlouch, H. *et al.* TLR9 Ligand (CpG Oligodeoxynucleotide) Induces CLL B-Cells to Differentiate into CD20(+) Antibody-Secreting Cells. *Front Immunol* **5**, 292 (2014).
300. Smith, M.A. *et al.* PRDM1/Blimp-1 controls effector cytokine production in human NK cells. *J Immunol* **185**, 6058-6067 (2010).
301. Wan, Y. & Wu, C.J. SF3B1 mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **121**, 4627-34 (2013).
302. Schmidlin, H., Diehl, S.A. & Blom, B. New insights into the regulation of human B-cell differentiation. *Trends Immunol* **30**, 277-85 (2009).
303. Kallies, A. *et al.* Plasma cell ontogeny defined by quantitative changes in blimp-1 expression. *J Exp Med* **200**, 967-77 (2004).
304. Nowak, D., Stewart, D. & Koefler, H.P. Differentiation therapy of leukemia: 3 decades of development. *Blood* **113**, 3655-65 (2009).
305. Wang, B. *et al.* An inhibitor of arachidonate 5-lipoxygenase, Nordy, induces differentiation and inhibits self-renewal of glioma stem-like cells. *Stem Cell Rev* **7**, 458-70 (2011).
306. Gupta, P.B. *et al.* Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell* **138**, 645-59 (2009).
307. Coupland, S.E. *et al.* Plasmacellular differentiation in extranodal marginal zone B cell lymphomas of the ocular adnexa: an analysis of the neoplastic plasma cell phenotype and its prognostic significance in 136 cases. *Br J Ophthalmol* **89**, 352-9 (2005).
308. Montes-Moreno, S. *et al.* Aggressive large B-cell lymphoma with plasma cell differentiation: immunohistochemical characterization of plasmablastic lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma with partial plasmablastic phenotype. *Haematologica* **95**, 1342-9 (2010).





