

**DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL·LULAR I ANATOMIA PATOLÒGICA
FACULTAT DE MEDICINA
UNIVERSITAT DE BARCELONA**

**CARACTERITZACIÓ CITOGENÈTICA I MOLECULAR DELS
LIMFOMES NO-HODGKIN HUMANS**

**ESTUDI DE LA INESTABILITAT GENÒMICA EN LIMFOMA DE
CÈL·LULES DEL MANTELL**

**Tesi presentada per Itziar Salaverria Frigola
per optar al grau de Doctor en Biologia**

**Director de la tesi: Professor Elías Campo Güerri
Codirectora de tesi: Silvia Beà Bobet
Barcelona, gener 2008**

Als meus pares i al meu germà

Al Mikel

Índex

ÍNDEX	3
AGRAÏMENTS	7
ABREVIATURES	12
INTRODUCCIÓ	16
EL SISTEMA IMMUNITARI I LA RESPOSTA IMMUNE	17
EL GENOMA, EL CROMOSOMA I EL CICLE CEL·LULAR.....	18
<i>El genoma</i>	18
<i>El cromosoma i cariotip humà</i>	18
<i>Alteracions de l'estructura del DNA</i>	21
Anàlisi citogenètic del cariotip	21
Tipus d'alteracions del DNA	21
Translocacions:.....	21
Guanys i amplificacions	22
Delecions	22
Polimorfisme de Canvi de Nucleòtid (SNP).....	23
Mutacions	23
Pèrdua d'Heterozigositat (LOH) i Disomia Uniparental (UPD)	24
<i>Cicle Cel·lular</i>	24
Control del cicle cel·lular	25
Punts de control o checkpoints	25
Complexos CDK-ciclins i el control del cicle cel·lular	25
CÀNCER.....	28
<i>Alteracions genètiques i càncer</i>	28
Oncogens, gens supressors de tumors (TSG) i gens de reparació del DNA	28
Oncogens	28
Gens supressors de tumors i gens de reparació del DNA.....	29
<i>Inestabilitat genètica</i>	32
Inestabilitat cromosòmica.....	33
Inestabilitat de microsatèl·lits.....	33
Mecanismes generadors d'inestabilitat.....	34

Punts fràgils	34
Eскурçament de les seqüències telomèriques	35
TÈCNIQUES CITOGENÈTIQUES I MOLECULARS	36
<i>Citogenètica Convencional (CC)</i>	36
<i>Hibridació in situ fluorescent (FISH)</i>	36
<i>Multicolor FISH (M-FISH)/Spectral Karyotyping (SKY)</i>	37
<i>RX-FISH</i>	38
<i>Hibridació Genòmica comparada (CGH)</i>	39
<i>Microarrays</i>	41
CGH array	41
SNP array.....	42
Microarrays d'expressió	43
<i>PCR quantitativa</i>	44
NEOPLÀSIES LIMFOIDES	44
<i>Classificació dels limfomes</i>	45
<i>Els limfomes de cèl·lules B</i>	47
Limfoma de cèl·lula B precursora	47
Limfoma limfoblàstic (B-LL).....	47
Leucèmia limfàtica crònica /Limfoma limfocític de cèl·lula petita (B-CLL)	47
Leucèmia prolimfocítica de cèl·lula B (B-PLL).....	48
Limfoma limfoplasmacític (LLP).....	49
Limfoma esplènic (SMZL) i ganglionar (NMZL) de la zona marginal	49
Tricoleucèmia (HCL)	50
Mieloma de cèl·lula plasmàtica o mieloma múltiple (MM).....	50
Limfoma Mucosa- associated Lymphoid Tissue (MALT).....	50
Limfoma fol·licular (FL)	51
Limfoma difús de cèl·lules grans (DLBCL).....	51
Limfoma B primari mediastínic (PMBCL)	52
Limfoma de cèl·lules del mantell (MCL).....	53
Limfoma B intravascular (IVL).....	58
Limfoma d'efusió primària (PEL).....	58
Limfoma de Burkitt (BL)	58
<i>Els limfomes de cèl·lula T</i>	59

Limfoma de cèl·lula T precursora	59
Leucèmia limfoblàstica de precursor T (T-ALL/Limfoma limfoblàstic (T-LBL)	59
Limfoma de cèl·lules perifèriques o Natural Killer.....	60
Leucèmia prolimfocítica de cèl·lula T (T-PLL).....	60
Leucèmia limfocítica de cèl·lules grans granulars tipus T (T-LGL).....	60
Leucèmia/ limfoma de cèl·lula T d'adults (ATLL).....	61
Micosis fungoides/Síndrome de Zézary	61
Limfoma perifèric de cèl·lules T, no especificat (PTCL-U).....	61
Limfoma anaplàsic de cèl·lules grans (ALCL)	61
ALTERACIONS CROMOSÒMIQUES EN LIMFOMES NO-HODGKIN.....	63
Alteracions primàries (translocacions).....	64
Alteracions secundàries	65
Alteracions secundàries en MCL.....	68
MATERIAL I MÈTODES.....	72
PROTOCOL CGH.....	73
PROTOCOL DE CULTIU DE SANG PERIFÈRICA	75
PROTOCOL DE CULTIU DE MOLL D'OS	75
PROTOCOL DE CULTIU DE CÈL·LULES CRIOPRESERVADES	75
DESCONGELACIÓ I CULTIU	75
PROTOCOL DE BANDES G	76
PROTOCOL DE FISH	76
PROTOCOL DE M-FISH.....	77
PROTOCOL DE CGH ARRAY	77
PROTOCOL PCR QUANTITATIVA.....	79
REACTIUS	81
APARELLS.....	83
OBJECTIUS	84
RESULTATS	86
TREBALL N°1: LEUK RES. 2006 AUG;30(8):923-34	87
TREBALL N°2 :CLIN ONCOL. 2007 APR 1;25(10):1216-22.....	101

TREBALL N°3 :CANCER. 2007 JUN 15;109(12):2473-80.....	110
TREBALL N°4(EN PREPARACIÓ)	120
DISCUSSIÓ.....	153
CONCLUSIONS.....	164
ANNEXES	167
<i>Annex 1. Haematologica. 2008 Jan;93(1):132-6.</i>	<i>168</i>
<i>Annex 2. J Clin Oncol. 2004 Sep 1;22:3498-506.....</i>	<i>169</i>
<i>Annex 3. Blood. 2005 Nov 1;106:3183-90</i>	<i>170</i>
<i>Annex 4. Blood. 2006 Feb 1;107(3):1101-7.....</i>	<i>171</i>
<i>Annex 5. Haematologica. 2004 Nov ;89:1322-31</i>	<i>172</i>
<i>Annex 6. Haematologica. 2006 Jan ;91:11-6.....</i>	<i>173</i>
<i>Annex 7. Leukemia (enviat).....</i>	<i>174</i>
<i>Annex 8. Br J Haematol. 2008.....</i>	<i>175</i>
<i>Annex 9. Int J Cancer. 2006 Dec 15;119(12):2768-74.....</i>	<i>176</i>
<i>Annex 10. Int J Cancer. 2006 Jan 15;118(2):357-63.....</i>	<i>177</i>
BIBLIOGRAFIA	178
GLOSSARI DE CONCEPTES I ANGLICISMES	197



AGRAÏMENTS

Aquí em trobo posant punt i final a més de 5 anys de vida pre-doctoral i no sé per on començar. El món de la recerca no és sempre fàcil però pels que treballem amb motivació i amb el convenciment que la nostra feina ha aportat alguna cosa nova al món científic, crec que el conjunt es fa satisfactori i compensa els molts entrebancs que et puguis anar trobant. Si vull resumir aquests anys, em quedo amb un dita basca “Asmoz eta Jakitez”-Amb voluntat i intel·ligència- que reflexa l’actitud necessària per a arribar al punt en el que em trobo ara.

Si algú s’imagina als doctorands com a rates de laboratori s’equivoca; la vida investigadora implica moltes més coses, moments d’alegria, moments de cansament, riures, bromes, viatges etc. en resum estones inoblidables que he compartit amb vosaltres i que no oblidaré mai.

Moltes persones han passat per la meva vida en els darrers temps aportant sempre un gra de sorra a aquest gran projecte que ara finalitza, sento si em deixo a algú.

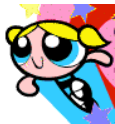


A la Magda Pinyol o la Mama Pinyol que ve a ser el mateix, per ser la millor companya de taula, per donar sempre aquell toc humà al dia a dia del laboratori, pels bons consells científics i personals dels quals he après molt!



Al Lluís, “que sempre ho sap tot”. Per tenir sempre una resposta per a qualsevol cosa, per salvar-nos de les invasions d’animals al laboratori donant sempre el toc de masculinitat i serenitat que un laboratori amb tantes dones necessita.

A la Ira i la Montsina ,alies ”Los ángeles de Pedro” o “Pequeñas pero matonas”.Per ensenyar-me el que vol dir ser “apanyadeta”, per la seva ajuda al laboratori i per ensenyar-me com es canta un bingo.



A l’Helena (La pendona) per compartir amb mi mil i un moments, des de les llargues hores de pràctiques i classes a la UAB fins a les moltes nits de juerga i pendoneo. Per ensenyar-me el valor de l’amistat i per animar el “cotarro” sempre.

A la Laura, la Laura G i la Míriam, les nenes del lab, per ajudar-me sempre que ha calgut i per crear un ambient immillorable al laboratori.



A la Laurilla-Marquesa per aportar el toc de glamour al laboratori amb les seves històries i aventurilles vàries. Perquè no tots venim de la mateixa realitat i un toc de contrast sempre t’aporta coses noves.

A l’Alba per aportar el toc d’il·lusió per la ciència que necessitava el laboratori. Per estar sempre preparada per ajudar i col·laborar.



A la Nica-Nikita, la meva companya incansable de tesi i la meva “secre”; per anar sempre un pas endavant i marcar-me el camí. Per compartir amb mi viatges i congressos, ensenyant-me que es pot ser simpàtic amb tothom. Per posar sempre aquell toc d’energia a qualsevol moment i ensenyant-me que cada dia s’ha de viure.

Al Pedrito, sempre rodejat de papers, per demostrar-nos el que implica ser un super-crack de la ciència, per tenir sempre respostes per a tot i molta energia per a ajudar a tothom.

A tota la gent que ha passat pel laboratori durant aquests sis anys, aportant sempre el seu gra de sorra. Especialment al Fredy i a l'Emma que malgrat ja no pertànyer al nostre grup sempre tindran el seu lloc en el nostre record i en les nostres bromes.



Als hematòlegs, l'Armando, en Cesc i l'Ana Ferrer per aportar el toc clínic a tots els treballs que hem fet plegats i repassar les corbes de supervivència i els p valors .



Als companys de l'Escola d'Hematologia: la Silvia, el Gaël, la Patricia, i la Mònica per col·laborar amb el grup activament i a la Dolors Colomer ser com una segona jefa per a tots nosaltres.



A l'Olga, el Toni i el Lluís per donar-me suport en els meus dubtes "patològics" i per amb la seva col·laboració donar sentit a l'afirmació del "jefe" que diu: "Som un grup multidisciplinar" .



A l'Anna Carrió i la Dolors Costa per ajudar-me en els meus dubtes citogenètics.

A la Candi i a la Sandra per oferir-me sempre la seva ajuda i fer agradables les meves estones a la Unitat de Genètica.



A la Teresa Roch, "la supersecre". Sempre atenta i amb un somriure per tothom. Per ajudar-me en tots els tràmits burocràtics que impliquen la vida de becari, obrir-me l'armari del material i fer-me sempre foradets a l'agenda del jefe.

A la Maria Garcia, per ajudar-me a la meva estada a Cambridge ensenyant-me coses noves que m'han ajudat molt en la meva recerca.

Als companys de la UAB, la Rosa Miró i el Jordi Camps per compartir amb mi idees i coneixements i munt de neu durant el congrés de Heidelberg.

A tota la gent del laboratori del Miquel Angel Peinado (MAP lab). Per obrir-me la porta del seu espai i ajudar-me en el que ha calgut.

Al Jairo i al Javi, els meus companys de carrera que han seguit el mateix camí que jo. Per les estones viscudes i les que vindran. Per no fer-me sentir sola en el món de la recerca.



A la Nuri, la vaki bebè, per ser la meva amiga i companya de viatges incondicional. Per mil moments plegades, pagant multes, agafant trens, i menjant entrepans de Bimbo. També per ensenyar-me a ser una bona catalana i recordar-me sempre que “lo gratis mola”.



A les vakes, per la seva amistat, i el seu suport, pels bons moments juntes: sopars, viatges, sortides etc. Per donar un toc de bogeria a la meva vida, sempre acompanyat de galetes de xocolata.

Als Joves Com Cal (JCC) per animar tots els caps de setmana, ponts i demés dies festius amb un munt d'activitats i excursions. Per ensenyar-me a estimar la muntanya i compartir amb mi informacions valuoses sobre condensadors, bigues, esquerdes i demés mogudes d'enginyers.

A la Silvia Beà (WT-forever) perquè no hauria pogut tenir una madrina de la ciència tant bona com ella. Quan comences sempre necessites que algú confiï en tu i aquesta persona ha estat la Sílvia. Gràcies per contestar les meves 30.000 consultes diàries, per corregir totes les meves coses i per ser la meva JEFA, el meu exemple i sobretot la meva amiga.



A l'Elias, "el Jefe", l'Amo o l'home més buscat, per ser demostrar-me el que és viure la recerca amb entusiasme i ensenyar-me que implica sacrifici, perseverança i molta, molta paciència. Per ser la persona amb més esperit de treball que conec i més capacitat per controlar mil coses a l'hora . Per saber valorar les meves aptituds i tolerar els meus defectes. Per ser però, davant de tot, un "jefe" "humà" que m'ha ajudat a madurar científica i personalment.

A la meva família pel seu recolzament, la seva admiració i reconeixement. Per recolzar-me en totes les decisions i aplaudir els meus èxits.



Al Mikel, per aparèixer i capgirar el meu món, per escoltar-me, per entendre'm i per ser el meu company d'aventurilles. Maite zaitut atzo, gaur eta beti.

En resum a tots vosaltres que heu omplert cadascun dels dies d'aquests últims 5 anys.

GRÀCIES!

ABREVIATURES

Per ordre alfabètic:

A	Adenina
ABC-DLBCL	<i>Activated B-cell DLBCL</i>
ACK1	Tyrosine kinase, non-receptor, 2
ACTL6	<i>Actin-like 6A</i>
ALCL	<i>Anaplastic Large T-cell Lymphoma</i>
ALK	<i>Anaplastic Lymphoma kinase gene</i>
AT	<i>Ataxia Telangiectasia syndrome</i>
ATLL	<i>Adult T-cell Leukemia Lymphoma</i>
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
ATR	<i>Ataxia Telangiectasia and Rad3 Related</i>
AURKA	<i>Aurora Kinase A</i>
BAC	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>
BASC	<i>BRCA1-associated genome surveillance complex</i>
BAX	<i>BCL2-associated X protein</i>
BCL-2	<i>B-Cell Leukemia/lymphoma 2</i>
BCL-6	<i>B-Cell Leukemia/lymphoma 6</i>
B-CLL	<i>Chronic Lymphocytic Leukemia</i>
BDH	<i>3-Hydroxybutyrate Dehydrogenase, type 1</i>
BIRC2	<i>Baculoviral IAP repeat-containing 2</i>
BL	<i>Burkitt Lymphoma</i>
BMI-1	<i>BM11 polycomb ring finger oncogene</i>
BRCA1	Breast Cancer 1
B-LL	<i>B-cell Lymphoblastic Lymphoma</i>
bp	Base pair(s)
C	Citosina
CASP-1	<i>Caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase</i>
CASP-4	<i>Caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase</i>
CC	<i>Conventional Cytogenetics</i>
CCDC50	<i>Coiled-coil domain containing 50</i>
CDK	<i>Cyclin Dependent Kinase</i>
CDK4	<i>Cyclin Dependent Kinase 4</i>
CENTB2	<i>Centaurin Beta 2</i>
CFS	<i>Common Fragile Sites</i>
CGH	<i>Comparative Genomic Hybridization</i>
CHK1	<i>Checkpoint Homolog (S. pombe) 1</i>
CHK2	<i>Checkpoint Homolog (S. pombe) 2</i>
CLU	<i>Clusterin</i>
CNAT	<i>Copy Number Analysis Tool</i>
COBRA-FISH	<i>Combinatorial Binary Ratio Labelling FISH</i>
DLBCL	<i>Diffuse Large B-cell Lymphoma</i>

DMIN	<i>Double diminutes</i>
DNA	<i>Deoxiribonucleic Acid</i>
DSB	<i>Double Strand Break</i>
ERCC5	<i>Excision Repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 5</i>
ESCO2	<i>Establishment of cohesion 1 homolog 2</i>
FC	<i>Flow cytometry</i>
FISH	<i>Fluorescence in situ Hybridization</i>
FL	<i>Follicular Lymphoma</i>
FANCC	<i>Fanconi anemia, complementation group C</i>
G	<i>Guanina</i>
GADD45a	<i>Growth Arrest and DNA-damage-inducible, alpha</i>
GCB-DLBCL	<i>Germinal Center B-cell DLBCL</i>
GMPS	<i>Guanine Monphosphate Synthetase</i>
GPR160	<i>G protein-coupled receptor 160</i>
HCL	<i>Hairy Cell Leukemia</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HSR	<i>Homogeneous Staining Region</i>
HTLV-1	<i>R-Cell leukaemia virus type I</i>
Ig	<i>Immunoglobuline</i>
IGH	<i>Immunohistochemistry</i>
IVL	<i>Intravascular Lymphoma</i>
JAK2	<i>Janus kinase 2</i>
KDa	<i>KiloDalton</i>
LIG4	<i>Ligase IV, DNA, ATP-dependent</i>
LLMPP	<i>Leukemia/Lymphoma Molecular Profiling Project</i>
LLP	<i>Lymphoplasmocytic Lymphoma</i>
LOH	<i>Loss of Heterozigosity</i>
LPP	<i>LIM domain containing preferred translocation partner in lipoma</i>
MALT	<i>Mucosa- associated Lymphoid Tissue</i>
MCL	<i>Mantle Cell Lymphoma</i>
MDM2	<i>Mouse double minute 2 homolog</i>
M-FISH	<i>Multicolor FISH</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MM	<i>Multiple myeloma/Plasma cell myeloma</i>
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
MTCP-1	<i>Mature T-cell proliferation-1 type A</i>
MYC	<i>v-Myc myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
NHL	<i>Non-Hodgkin Lymphoma</i>
NMZL	<i>Nodal Marginal Zone Lymphoma</i>
ON	<i>Over night</i>
OPA1	<i>Optic atrophy 1</i>
PAK2	<i>P21 (CDKN1A)-Activated Kinase 2</i>

PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
PDCD10	<i>Programmed Cell Death 10</i>
PIK3	<i>Phosphatidylinositol 3- kinase</i>
P16^{INK4a}/ARF	<i>CDK4 inhibitor P16-INK4/ARF</i>
PMBCL	<i>Primary Mediastinic B-cell Lymphoma</i>
PPP1R2	<i>protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 2</i>
PTCL-U	<i>Peripheral T-cell lymphoma–unspecified</i>
RAD23	<i>RAD23 homolog B</i>
RB1	<i>Retinoblastoma</i>
REL	<i>Reticuloendotheliosis Viral Oncogene homolog</i>
RFC4	<i>DNA Replication Factor C</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RPM	<i>Revolutions per Minute</i>
RS	<i>Richter Syndrome</i>
SIAH2	<i>Seven in Absentia Homolog 2</i>
SIAT1	<i>ST6 beta-galactosamide alpha-2,6-sialyltransferase 1</i>
SKY	<i>Spectral Karyotyping</i>
SMZL	<i>Splenic Marginal Zone Lymphoma</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polimorphism</i>
SRY	<i>Sex-determining region Y</i>
T	<i>Timidina</i>
RT	<i>Room temperature</i>
T-ALL	<i>Acute Lymphoblastic Leukemia</i>
TBE	<i>Tris Borate EDTA</i>
TCL-1	<i>T cell leukemia 1</i>
TCR	<i>T-cell receptor</i>
TDF	<i>Testis-determining factor</i>
T-LBL	<i>Lymphoblastic Lymphoma</i>
T-LGL	<i>Large Granular Lymphocytes T Leukemia</i>
TNFRSF10D	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, member 10d</i>
TP53	<i>Tumor Protein p53</i>
TPA	<i>Tetraphorbol Myristyl Acetate</i>
T-PLL	<i>T-cell prolymphocytic Leukemia</i>
TRAIL	<i>Tumor-necrosis factor-related Apoptosis Inducing Ligand</i>
TFRC	<i>Transferrin Receptor</i>
TSG	<i>Tumor Supressor Gene</i>
UPD	<i>Uniparental Disomy</i>
XPA	<i>Xeroderma pigmentosum, complementation group A</i>
YEATS	<i>YEATS domain containing 2</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

INTRODUCCIÓ

El sistema immunitari i la resposta immune

El sistema immunitari és el sistema encarregat de lluitar contra els agents infecciosos que entren a l'organisme i de construir un sistema de defensa que eviti l'entrada de paràsits, actuant contra les possibles malalties i infeccions. Els ganglis limfàtics són components del sistema immunitari. Els ganglis limfàtics actuen com a filtres, sent petits dipòsits de teixit connectiu que contenen limfòcits i que recullen i destrueixen bacteries i virus (**Figura 1**). Quan el cos lluita contra una malaltia els limfòcits es multipliquen i produeixen la característica inflació. El cos humà presenta entre 500-600 ganglis que es troben agrupats i localitzats a les aixelles, al coll al pit, a l'abdomen i engonals. Distingim diferents parts del gangli limfàtic, **el còrtex** que és l'àrea més rica en cèl·lules B i la que es distingeixen els fol·licles primaris¹ (Rics en limfòcits B madurs en repòs) i els fol·licles secundaris. Els fol·licles secundaris es formen a partir dels primaris després de l'estimulació antigènica i presenten mantell i centre germinal. Per altra banda dins del gangli limfàtic trobem el **paracòrtex**, àrea rica en cèl·lules T i la **medul·la**: amb cèl·lules B, T, cèl·lules plasmàtiques i abundants macròfags.

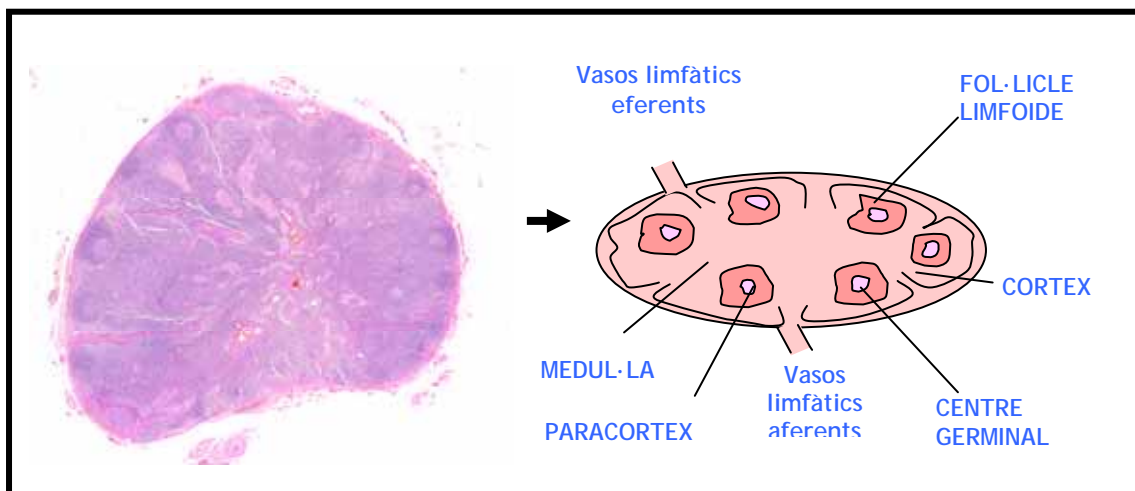


Figura 1. Esquema del gangli limfàtic

Existeixen dos tipus principals de limfòcits depenent del seu origen i de la seva funció, **els limfòcits T** que es diferencien inicialment al timus i **els limfòcits B** que es diferencien al fetge i la melsa en el fetus i al moll d'os en edat adulta. Durant el seu desenvolupament, els limfòcits T i B adquireixen receptors específics per antígens.

Els limfòcits T són responsables de la resposta immune realitzada per cèl·lules així com de les funcions de cooperació que es realitzen per tal que es puguin desenvolupar totes les respostes immunes, entre les quals s'inclou la resposta d'anticossos per limfòcits B.

Els limfòcits encarregats de les funcions efectores de la immunitat cel·lular són els limfòcits T citotòxics o CD8⁺ mentre que els limfòcits T cooperadors, *helper*² o CD4⁺ s'encarreguen d'iniciar la cascada de la resposta immune coordinada mitjançant interacció amb un complex major d'histocompatibilitat (MHC) de classe II.

Dels **limfòcits B** depèn la immunitat mediada per anticossos i l'activitat específica de fixació d'antígens. Els limfòcits B donen origen a les cèl·lules plasmàtiques que produeixen anticossos. Quan un limfòcit reconeix un antígen, les cèl·lules B queden activades i migren al centre germinal; l'estimulació dels limfòcits per antígens pot accelerar el procés migratori fins a 10 cops més del normal, produint la clàssica inflamació anomenada limfadenopatia³.

Tant els limfòcits T com els B circulen de manera constant a través dels ganglis limfàtics, entrant al gangli mitjançant el sistema sanguini i creuant la paret dels vasos; aquest procés rep el nom de diapèdesi.

El genoma, el cromosoma i el cicle cel·lular

El genoma

Anomenem genoma a tot el material genètic contingut a les cèl·lules d'un l'organisme en particular. En general, quan parlem de genoma en referim al DNA contingut en el nucli, que està organitzat en cromosomes, tot i que també existeix el genoma mitocondrial. El genoma humà té 6.000 milions de parells de bases (bp) incloent dues còpies molt similars d'un genoma haploide de 3.000 milions de bp. El genoma està dividit en 24 fragments, els quals es condensen formant els 24 cromosomes humans que existeixen. El genoma humà està compost per uns 25.000-30.000 gens diferents que codifiquen per diferents funcions essencials. També existeixen regions no codificants i regions que contenen el anomenats pseudogens. Els pseudogens són còpies d'un gen que normalment no presenten introns ni regió reguladora.

El cromosoma i cariotip humà

En la construcció d'un cariotip humà els cromosomes autosòmics es numeren de l'1 al 22 en un ordre decreixent de mida i els cromosomes sexuals són anomenats X i Y.

L'estructura del cromosoma està dividida en dos braços separats pel centròmer⁴, el braç p que és el superior i el braç q que està situat per sota del centròmer. Anomenem **cromàtide** a cadascuna de les unitats longitudinals d'un cromosoma quan està duplicat.

Els cromosomes es classifiquen en funció de la posició del seu centròmer en **metacèntrics** (els dos braços presenten la mateixa longitud), **sub-metacèntrics** (braços de longitud desigual) i **acrocèntrics** (el centròmer està pròxim a l'extrem del cromosoma i el braç p està compost de satèl·lits, excepte Y, que contenen còpies redundants de gens de RNA ribosòmic) (**Figura 2**).

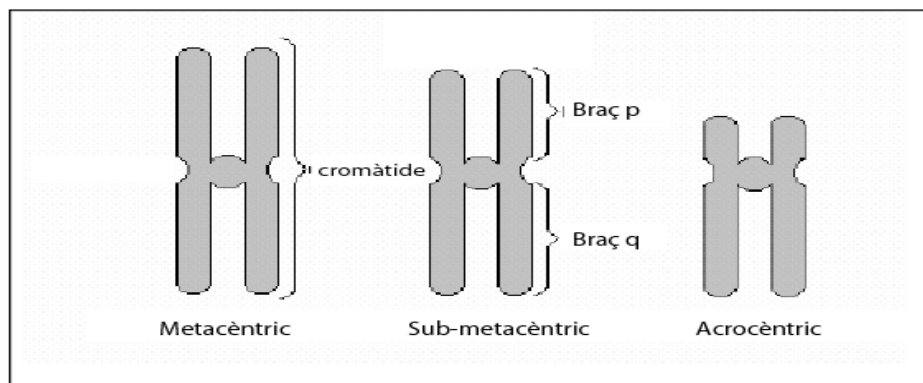


Figura 2. Estructura del cromosoma

El cariotip és la representació dels cromosomes ordenats d'acord amb la seva longitud i la posició relativa del centròmer. La possibilitat de poder representar gràficament el cariotip d'una cèl·lula va sorgir a la dècada dels 70, quan van aparèixer diferents mètodes mitjançant els quals s'aconseguia visualitzar els cromosomes mitòtics.

Alguns colorants utilitzats per a la tinció dels cromosomes tenen una especial afinitat per a tenyir determinades porcions del DNA en funció de la riquesa de adenina (A)-timina (T) o citosina (C)-guanina (G). És per això que els cromosomes prenen un aspecte bandejat en ser tenyits. D'aquesta manera cada cromosoma presenta un patró de bandes⁵ específic i en conseqüència, un aspecte únic, permetent per tant la identificació i numeració.

Algunes tècniques de bandejat utilitzades són:

Bandes G: Tècnica que mitjançant la tinció amb colorant Giemsa permet una tinció donant un patró de bandes fosques i clares. Les bandes G-clares presenten un alt contingut de G i C, són zones de replicació primerenca i són riques en gens,(Sumner et al., 1993) mentre que les fosques corresponen a les riques en A i timina T, són de replicació tardana i tenen poc contingut de gens. La tècnica del bandejat per bandes G rep el nom comú de Citogenètica Convencional (CC) (**Figura 3A**).

Bandes Q: Fou el primer bandeig cromosòmic utilitzat; és de tipus fluorescent i es realitza mitjançant una tinció amb Quinacrina. Les bandes brillants corresponen a les

bandes fosques de la tinció de Bandes G. L'inconvenient és que requereix la utilització d'un microscopi de fluorescència (**Figura 3B**).

Bandes R (reverse-bands): Són aquelles bandes que s'obtenen utilitzant agents que donen als cromosomes un patró de bandes totalment oposat a les bandes G com per exemple el taronja d'acridina (**Figura 3C**).

Cada cromosoma d'una cèl·lula somàtica presenta un patró continu de bandes. Cada banda està localitzada en una regió ben delimitada del cromosoma. Anomenem regió cromosòmica a aquella àrea de cromosoma que està limitada entre dos marques. Aquestes marques poden ser també els límits del cromosoma o el centròmer. El patró original de bandes es va descriure a la Conferència de Paris de 1971 basat en els patrons observat de bandes, G, Q i R.(ISCN 2005, 2005)

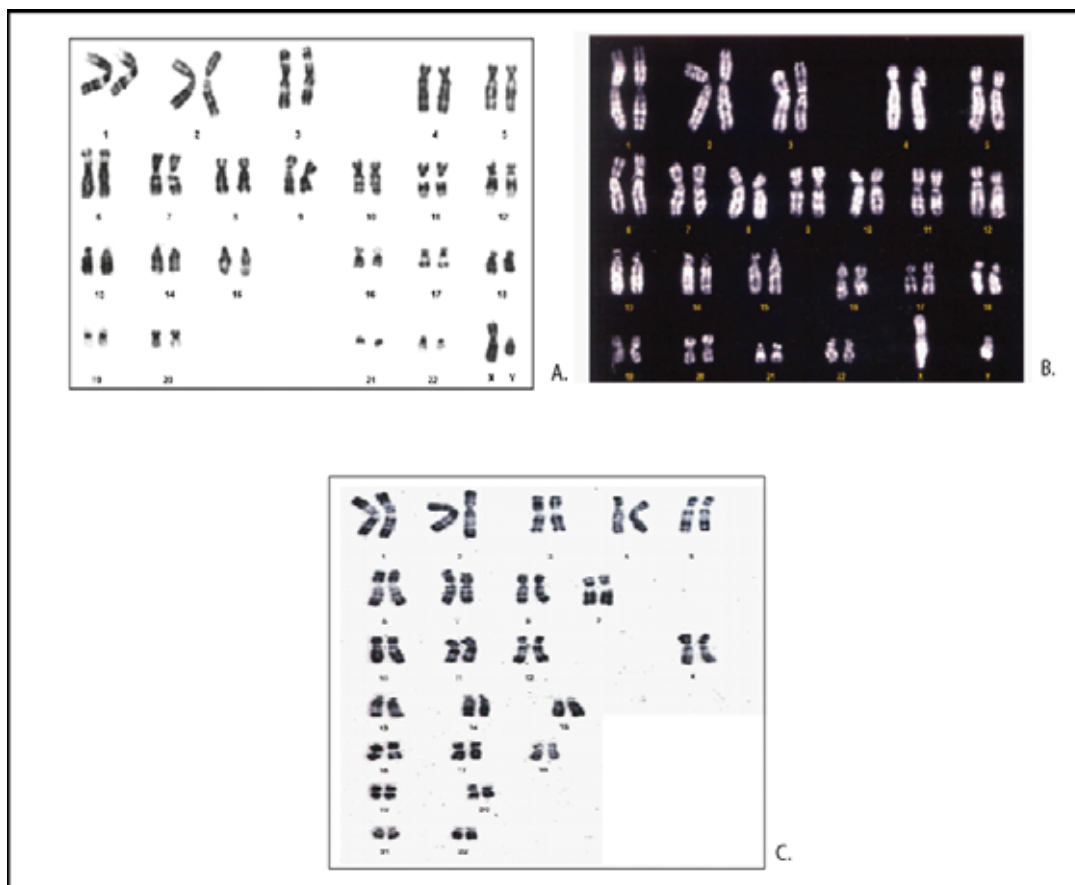


Figura 3. Ideograma de A) Bandes G, B) Bandes Q, i C) Bandes R

Alteracions de l'estructura del DNA

Anàlisi citogenètic del cariotip

En l'estudi d'un cariotip s'han de tenir en compte diferents aspectes del cas que s'estudia. Els punts bàsics que cal tenir en compte són: nombre de cèl·lules estudiades, la dotació cromosòmica (haploid, diploid, etc.), el sexe (cromosomes sexuals), el nombre de cromosomes reorganitzats, els cromosomes que estan implicats, els punts de trencament, i el nombre de cèl·lules en el que s'identifiquen cadascuna de les alteracions. La necessitat d'utilitzar un llenguatge comú per tal de descriure les alteracions citogenètiques observades tant el món de les neoplàsies com en altres camps de la recerca biomèdica, com per exemple en el diagnòstic prenatal, va fer que urgís la necessitat d'una nomenclatura estàndard. La nomenclatura cromosòmica humana que s'utilitza en l'actualitat està basada en els resultats de diferents conferències internacionals (Denver 1960, London 1963, Chicago 1966, Paris 1971, Paris 1975, Estocolm 1977, Paris 1980, Memphis 1994 i Vancouver, 2004). L'objectiu d'aquest projecte fou unificar la nomenclatura utilitzada en la descripció de les alteracions cromosòmiques mitjançant la utilització d'un manual de nomenclatura comú que fos periòdicament revisat i actualitzat. Aquest manual rep el nom de An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN) i la darrera edició és del 2005.(ISCN 2005, 2005)

Tipus d'alteracions del DNA

Translocacions:

Definim translocació com tot canvi estructural que implica dos o més cromosomes i que té com a conseqüència la formació d'un o més cromosomes reorganitzats amb el material dels cromosomes originals implicats. S'originen quan es produeixen dos punts de trencament en dos cromosomes diferents i una mala reparació. Produeixen proteïnes desregulades i sobre-expressades o bé proteïnes híbrides, també anomenades de fusió o quimèriques. Existeixen dos tipus de translocacions, les **translocacions equilibrades**, que són aquelles que no impliquen ni pèrdua ni guany de material cromosòmic i les **translocacions desequilibrades** que sí que impliquen pèrdua o guany de material. Cada cop existeixen més evidències que demostren que les reorganitzacions cromosòmiques al nucli cel·lular no són a l'atzar. S'ha observat en cèl·lules de mamífers i aus que en nucli interfàsic els cromosomes es col·loquen en posicions concretes en funció de la

densitat gènica o de la mida, i que aquesta proximitat física facilita les translocacions cromosòmiques afavorint els intercanvis entre cromosomes propers. (Sachs et al., 1997)

Guanys i amplificacions

Anomenem guany o amplificació al fenomen que implica un augment de la dosi gènica. Pot també ser causat per diferents factors, per una mala segregació dels cromosomes durant la mitosi donant lloc a trisomies o polisomies més extenses o bé, per una mala replicació del DNA donant lloc a més d'una còpia d'una regió cromosòmica i produint generalment, com a conseqüència, la sobre-expressió dels gens amplificats. Anomenem guany quan la dosi gènica s'incrementa en una sola còpia mentre que parlem d'amplificació quan el nombre de còpies és major o igual a 2. A vegades existeixen tantes còpies de la regió amplificada que aquestes poden formar els seus propis pseudocromosomes petits, anomenats dobles diminuts (DMIN) (**Figura 4A**). També en les tincions cromosòmiques podem observar regions de tinció homogènia (HSR) que són considerades indicadors citogenètics d'amplificació (**Figura 4B**). En càncer els guanys/amplificacions de material genòmic poden estar associats a guanys de dosi gènica de gens involucrats en proliferació els quals són anomenats proto-oncogens.

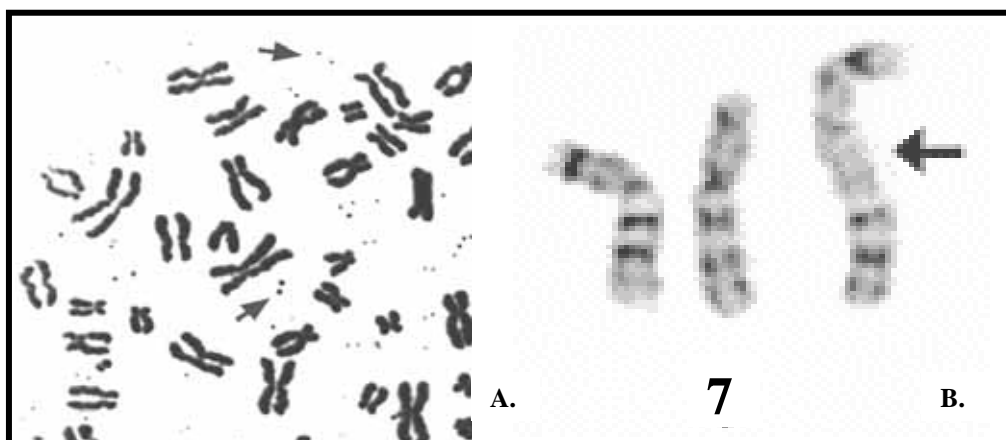


Figura 4. Indicadors d'amplificació en estudis citogenètics A) Dobles diminuts B) *Homogeneous staining region*.

Delecions

Anomenem deleció a tota pèrdua de material cromosòmic. Es poden donar com a conseqüència de la formació d'un o dos punts de trencament i una mala reparació, o bé per un fenomen de no-disjunció mitòtica⁶. Hi ha diferents tipus de delecions, per una banda la pèrdua d'un o dels dos cromosomes (monosomia o nullosomia, respectivament), delecions terminals, intersticials, o bé microdelecions que són també

anomenades de manera comú mutacions. En l'estudi de les neoplàsies l'efecte més comú d'aquestes delecions és la pèrdua d'un o més gens supressors de tumors (TSG).

Polimorfisme de Canvi de Nucleòtid (SNP)

El Polimorfisme de Canvi de Nucleòtid (SNP) es va descriure per primer cop a mitjans dels anys 80, quan mitjançant la utilització d'enzims de restricció es van descobrir variacions en la mida dels fragments del DNA fragmentat. (Botstein et al., 1980) Definim un SNP com una variació de la seqüència de DNA que es dona quan un únic nucleòtid és diferent entre els membres d'una espècie. Per exemple, el mateix fragment de DNA seqüenciat en diferents individus presenta les seqüències AAGCCTA i AAGCTTA. Si aquest canvi presenta una freqüència en la població més gran d'un 1% es diu que existeixen dos al·lells: C i T. La majoria dels SNPs presenten només dos al·lells. Les variacions en les seqüències de DNA humana poden tenir un paper en el desenvolupament de malalties, resposta a patògens, productes químics, drogues, etc.

Mutacions

Anomenem mutació al fenomen pel qual es produeix una alteració del material genètic, és a dir, de l'estructura del DNA de la cèl·lula. Existeixen diferents classes de mutacions; per una banda existeixen les **substitucions de bases**, les quals es donen en regions de DNA codificants o no codificants. Aquestes poden ser de dos tipus, les mutacions sinònimes, quan no es dona un canvi d'aminoàcid, o bé no sinònimes quan sí que es dona un canvi aminoacídic. Aquest canvi aminoacídic pot ser **conservatiu**, quan el nou aminoàcid presenta propietats similars o bé **no conservatiu** quan l'aminoàcid nou presenta propietats diferents.

Per altra banda existeixen les mutacions que donen lloc un **canvi en el nombre total de bases**, que poden ser causades per una inserció de material, una delecio o una duplicació d'una sola base, d'un triplet o de moltes bases.

Finalment, existeixen les **mutacions en el DNA no codificant** que són aquelles que tenen lloc en els llocs de *splicing*⁷ o a les regions reguladores.

Les mutacions o canvis de la seqüència de nucleòtids d'un gen, acompanyades de la delecio o inactivació de l'altra còpia són un fenomen molt freqüent d'inactivació de TSGs en molts tipus de neoplàsies.

Pèrdua d'Heterozigositat (LOH) i Disomia Uniparental (UPD)

La Pèrdua d'Heterozigositat (LOH) implica la pèrdua d'una de les contribucions paternes de part del genoma. Aquesta pèrdua pot ser deguda a la deleció d'una de les còpies, o bé, al fenomen de Disomia Uniparental (UPD) en el qual la informació genètica d'una determinada regió cromosòmica o gen prové només d'un dels dos progenitors (**Figura 5**). La presència de regions amb UPD ve determinada per un fenomen de no-disjunció mitòtica en el qual els cromosomes es segreguen de manera errònia durant la mitosi, o bé, a un fenomen de recombinació mitòtica⁸. Aquest fenomen està molt estudiat en càncer donat que pot suposar un mecanisme alternatiu a la deleció en la inactivació de TSGs.

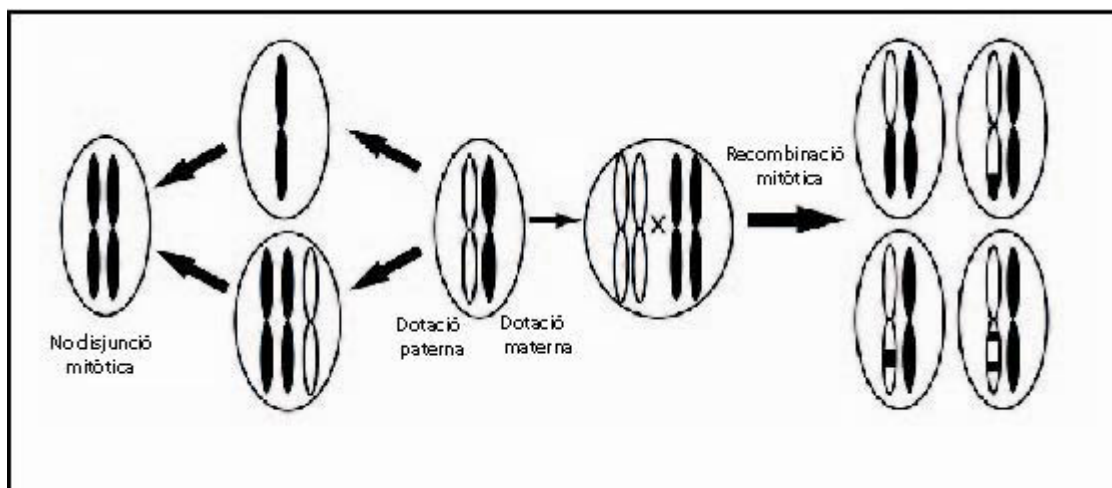


Figura 5. Esquema dels errors en la mitosi que produeixen el fenomen de UPD

Cicle Cel·lular

Anomenem cicle cel·lular al procés fisiològic en el qual la cèl·lula es divideix en dos, permetent la regeneració del teixit, de l'òrgan i de l'organisme del qual forma part. Aquest procés està dividit en una sèrie de fases que es donen de manera ordenada. Les dues fases més importants són la fase S (síntesi) en la qual té lloc la replicació del material genètic, passant de 2N a 4N, i la fase M (mitosi) en la que tindrà lloc la divisió cel·lular. És en aquest punt quan els microtúbuls citoplasmàtics es reorganitzen i formen el fus mitòtic, en els quals els cromosomes condensats s'uniran a l'anomenada placa metafàsica⁹ (metafase). Un cop ordenats, els cromosomes es segregaran (anafase) de manera que cadascun dels dos nous nuclis tindrà una còpia de cadascun dels cromosomes. (Heichman & Roberts, 1994)

Control del cicle cel·lular

Tot el cicle cel·lular està sotmès a un estricte control necessari perquè cada fase es doni en el moment precís, de manera seqüencial. S'han descrit dos tipus de control de la maquinària que regula aquest cicle; per una banda existeixen els anomenats punts de control o *checkpoints*¹⁰ que controlen l'acabament de les diferents fases i poden retardar, en cas que sigui necessari, la progressió del cicle cap al següent estadi. Per l'altra existeix el control l'exercit per una cascada de fosforilacions de proteïnes que fa que s'avanci a través de les diferents fases.(Collins et al., 1997)

Punts de control o checkpoints

Els punts de control tenen una funció més aviat de supervisió, detectant els errors en punts crítics del cicle cel·lular, ja sigui controlant la mida de les cèl·lules, la replicació del DNA o la segregació dels cromosomes. **El punt de control de la restricció**, que es troba en la fase G1 tardana, comprova que la cèl·lula hagi generat la massa necessària per a seguir endavant i començar la síntesi de DNA. La superació del punt de control de restricció porta a la cèl·lula a avançar al llarg del cicle cel·lular convertint-se en un punt clau de l'acció dels sistemes de control de proliferació cel·lular.(Sherr, 1996)

En finalitzar la fase G2 existeix un altre **punt de control G2-M**, en el qual la cèl·lula comprova que les condicions són adequades per dividir-se, és a dir, que s'ha duplicat la seva massa i que s'ha completat la replicació del DNA; a partir d'aquest punt la cèl·lula pot entrar en mitosi. A la fase M també existeix un **punt de control M** que assegura una correcta organització i desorganització del fus mitòtic.

El punts de control de dany al DNA es troben a tres fases del cicle diferents: a la transició G1/S, al control de la progressió a través de la fase S i a la transició G2/M. Aquests punts de control asseguren que una cèl·lula que presenta dany al DNA no progressi a través del cicle.(Paulovich et al., 1997)

Complexos CDK-ciclins i el control del cicle cel·lular

En la progressió del cicle cel·lular també intervé un segon tipus de control a on hi participen un grup de serina/treonina quinases conegudes com a quinases dependents de ciclins (CDK) que es troben regulades per una subunitat reguladora anomenada ciclina i s'expressen en determinats moments al llarg del cicle (**Figura 6**). Les CDK són unes proteïnes que es caracteritzen per ser inactives en la seva forma monomèrica, necessitant la unió a una ciclina per ser actives. En eucariotes s'han descrit vuit CDKs

tot i que només CDK1 (Cdc2), CDK2, CDK4 i CDK6 són necessàries per a la regulació del cicle. Totes les CDK són serina/treonina quinases amb un pes molecular d'aproximadament 30-40 kDaltons (kDa)¹¹ i una homologia d'un 50% entre elles. Presenten una sèrie de dominis típics de les quinases amb una regió altament conservada al domini III anomenada PSTAIRE¹², que permet que es produeixi la unió amb la ciclina corresponent i un residu de treonina (Thr-161 a cdc2 i Thr-160 a CDK2) al domini VIII. Aquest residu de treonina quan es fosforila activa l'activitat quinasa de la proteïna. Aquests dos dominis són molt importants per a la regulació d'aquestes CDKs.(Pines, 1996)

Les ciclins són subunitats activadores que s'uneixen a diferents CDKs en diferents moments del cicle cel·lular, es caracteritzen per una expressió no constant, sinó cíclica al llarg del cicle cel·lular. L'activitat de cada CDK és dependent del patró d'expressió de cada ciclina. Tots els membres que formen part de la família de les ciclins presenten una regió molt similar d'uns 100 aminoàcids, anomenada *cyclin box*¹³, que és la que està implicada a la unió amb les CDKs.(Hunter & Pines, 1994)

En el control del cicle cel·lular les ciclins es descriuen segons la fase en que actuen, de manera que les ciclins E i D (D1, D2 i D3) són les anomenades ciclins de fase G1, tenen una vida mitjana curta i els seus nivells es regulen per transcripció, mentre que les ciclins A i B són les anomenades ciclins mitòtiques sent estables durant la interfase però degradades de forma ràpida i específica durant la mitosi.

La progressió a través del cicle ve mitjançada per una activació/inactivació dels complexos que formen les ciclins i les CDKs. Aquests complexos tenen un paper molt important en el control de la diferenciació, senescència, o quiescència de les cèl·lules.

Quan les cèl·lules surten de G0 com a conseqüència dels estímuls mitogènics, s'indueix la Ciclina D (CCND1, CCND2 i CCND3) i la seva unió a CDKs (CDK4 i CDK6), sent la transició G1/S on es dona el seu punt més alt d'activitat catalítica. Aquests complexos poden fosforilar alguns substrats que són necessaris per a sortir de la fase G1, com per exemple la proteïna del retinoblastoma (RB1) entre d'altres, la qual controla alguns factors de transcripció, com per exemple, E2F. Fins que no es produeix una fosforilació de RB1 no s'allibera E2F i no exerceix la seva funció sobre gens de fase S.

A les cèl·lules que es troben en un estat de proliferació, l'expressió de Ciclina E (CCNE), la qual s'uneix formant complex amb CDK2, és periòdica i màxima a la transició G1-S. Aquest complex apart de contribuir també a la fosforilació de RB1 també exerceix un paper en la replicació del DNA un cop superat el punt de restricció.

Al mateix temps, la CCNE també és regulada per E2F, facilitant la fosforilació de RB1 i en conseqüència l'alliberament d'E2F donant-se per tant un fenomen de retroalimentació positiva. Un cop la cèl·lula entra en fase S es produeix una progressiva degradació de CCNE i en conseqüència una disminució de la seva activitat d'E2F.

Per altra banda la Ciclina A (CCNA) en unió en complex a CDK2, presenta un paper molt important tant en la transició G1/S, com en la replicació del DNA. Sembla ser, que juntament amb el complex CCNE/CDK2, el complex CCNA/CDK2 important per als orígens de replicació on la seva fosforilació promou la síntesi de DNA. Per altra banda aquest complex també presenta un paper important per a l'entrada en mitosi de la cèl·lula.

Finalment, el començament de la fase M es regulat per un conjunt de cascades de quinases i fosfatases que regulen l'activitat de les CDKs. Cdc2 forma complexos amb CCNA i CCNB. Aquests complexos mantenen a RB en un estat hiperfosforilat fins que les cèl·lules no completin la mitosi i tornin a G1/G0.

Pel correcte funcionament del cicle cel·lular s'han de controlar aquests complexos de manera estricta. Els mecanismes que controlen aquests complexos regulen el control en la taxa de síntesi i degradació de les diferents subunitats dels complexos, la unió de les dos subunitats, les fosforilacions activadores i desactivadores de les CDKs, entre d'altres.

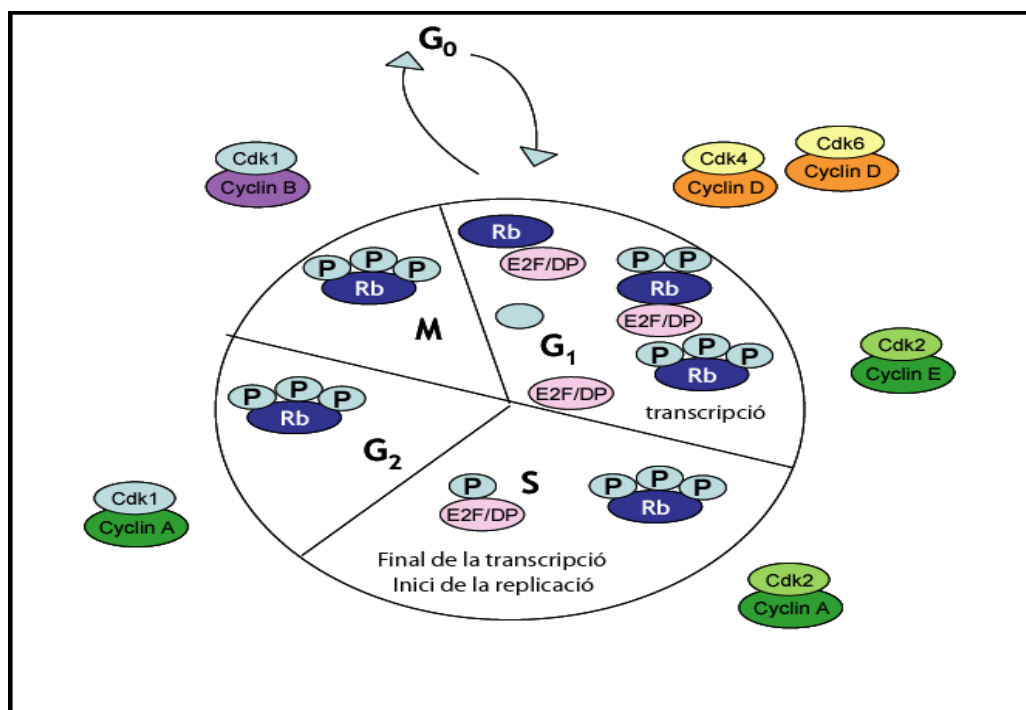


Figura 6. Mecanisme de control de cicle cel·lular mitjançant complexos Ciclina-CDK.

Càncer

Alteracions genètiques i càncer

El càncer engloba un grup de malalties caracteritzades per un creixement excessiu i descontrolat de les cèl·lules que envaeixen i danyen teixits i òrgans podent provocar la mort de l'individu. Està basat en dos processos successius, un fenomen augment de la proliferació d'un conjunt de cèl·lules, anomenat neoplàsia, i la posterior adquisició per part d'aquest grup de cèl·lules de capacitat invasiva, permetent que escapin del seu lloc natural i colonitzin i proliferin en altres teixits. Per tant, la connexió entre cicle cel·lular i càncer és òbvia, donat que la maquinària cel·lular és l'encarregada de controlar la proliferació cel·lular, i en conseqüència, qualsevol alteració que es produeixi en algun dels punts de control pot desencadenar una proliferació descontrolada del conjunt cel·lular.

Les alteracions d'un tumor es poden subdividir en alteracions primàries i en alteracions secundàries. Anomenem **alteracions primàries** aquells canvis que es produeixen inicialment a la cèl·lula neoplàsica i que són sovint úniques i específiques del tipus tumoral; tractant-se, en gran part dels casos, de translocacions. D'altra banda, els tumors presenten unes alteracions addicionals a les primàries que reben el nom d'**alteracions secundàries**. Les alteracions secundàries s'associen generalment a la progressió clínica del tumor i en estadis avançats de la malaltia poden ser molt nombroses. Malgrat no ser tant específiques de tumor com les primàries, no es donen a l'atzar i acostumen a ser guanys, amplificacions o pèrdues de material cromosòmic, o bé mutacions.

Els gens involucrats en tots dos tipus d'alteracions presenten un paper decisiu en la formació del tumor, en capacitat invasiva del teixit sa d'aquest i en la seva progressió i acostumen a ser gens acostumen a ser oncogens, TSGs o gens implicats en la reparació del DNA .

Oncogens, gens supressors de tumors (TSG) i gens de reparació del DNA

Oncogens

Dins del conjunt de gens que configuren el genoma, els oncogens són aquells gens modificats que augmenten la malignitat de la cèl·lula tumoral. Normalment, els oncogens estan implicats en estadis primerencs del procés tumoral, augmentant les

possibilitats de que la cèl·lula normal es torni tumoral. Els oncogens són versions mutades dels anomenats proto-oncogens. Definim **proto-oncogen** com aquell gen que pot esdevenir un oncogen després d'una mutació o d'un augment d'expressió. Els proto-oncogens codifiquen per a proteïnes que ajuden a regular el creixement cel·lular i la diferenciació i estan sovint involucrats en processos de transducció de senyals i execució de senyals mitogènics. Les funcions més freqüents són: receptors tirosina quinases citoplàsmics, factors de transcripció etc. Després de l'activació, el proto-oncogen esdevé oncogen. Existeixen diferents mecanismes per l'activació dels proto-oncogens com les mutacions, les amplificacions i les translocacions. Alguns exemples són:

BCL-2: És un gen localitzat a 18q21 que es va detectar per primer cop en Limfoma Fol·licular de cèl·lula B. La seva funció és bloquejar la mort cel·lular d'algunes cèl·lules, com per exemple, els limfòcits. *BCL-2* resulta sobre-expressat com a resultat de la translocació t(14;18) que juxtaposa el locus *IGH* amb el gen, causant una major supervivència dels limfòcits B. La sobre-expressió de *BCL-2* està associada a un mal pronòstic en diferents càncers.

BCL-6: *BCL-6* està localitzat a 3q27 i codifica per un repressor de la transcripció específic de seqüència. Està freqüentment translocat i hipermutat en Limfoma Difús de Cèl·lules Grans i sembla tenir un paper en la patogènesi d'aquest tumor.

MYC: El gen *MYC* és l'homòleg cel·lular del retrovirus aviar en vertebrats (*v-MYC*). Es troba localitzat al cromosoma 8 (8q24). Causa immortalització cel·lular, pot induir apoptosi i funciona com a factor de transcripció que regula la transcripció de dianes específiques. En estat normal s'expressa en cèl·lules que proliferen, accelerant el cicle cel·lular escurçant la fase G1. Mutacions, sobre-expressió, reorganitzacions i translocacions d'aquest gen estan associades a una gran varietat de tumors hematopoètics, entre els quals es troba el Limfoma de Burkitt .

Gens supressors de tumors i gens de reparació del DNA

A banda dels oncogens existeixen altres tipus de gens la mutació dels quals pot causar l'aparició de càncer, són els anomenats TSGs i els gens de la maquinària de reparació del DNA. Els TSGs són gens que redueixen la probabilitat que una cèl·lula es transformi en cancerígena. Els TSGs treballen inhibint la proliferació cel·lular excessiva per tant la pèrdua de funcionalitat d'un TSG mitjançant mutació o deleció augmenta la probabilitat que es produeixi un tumor. D'aquesta manera, un gen supressor tumoral

alterat es pot considerar similar a un oncogen. Alguns exemples de TSGs són: *TP53*, *P16^{ink4a}/ARF* i *RB1*.

TP53: És un gen localitzat al cromosoma 17 (17p13). Codifica per una fosfoproteïna nuclear que actua com a factor de transcripció sobre diferents gens que són *TP53* dependents a l'hora de realitzar les seves funcions. Actualment es considera que la proteïna codificada per *TP53* juga un paper essencial en la regulació dels punts de control del manteniment de la integritat del genoma, bloquejant el cicle cel·lular (específicament de la transició de G0 a G1) i activant l'apoptosi, de tal manera que evita l'acumulació de mutacions potencialment oncogèniques i la inestabilitat genòmica. S'han descrit diferents gens modulats per l'acció de *TP53*, alguns són gens implicats en el bloqueig cel·lular com per exemple *P21* o *GADD45a* i d'altres estan implicats en vies d'apoptosi com *BAX*. Els seus nivells d'expressió són molt baixos i té un temps de vida curt en cèl·lules normals però s'ha demostrat que en situacions d'estrès *TP53* es pot activar, augmentant de manera considerable els seus nivells, segurament degut a un augment del ritme de traducció del mRNA. (Chowdary et al., 1994) Les inactivacions de *TP53* tenen un efecte important en l'aparició de càncers trobant-se en un 50% dels tumors humans, donat que impliquen un increment de la capacitat de proliferació, una disminució de l'apoptosi, un augment de la inestabilitat genètica i la potenciació de l'angiogènesi¹⁴.

P16^{ink4a}/ARF: Aquest gen està localitzat al cromosoma 9, concretament a 9p21. El seu producte té capacitat d'unir-se a *CDK4* i *CDK6*, inhibint la seva activitat i en conseqüència la progressió de G1/S. El complexos *CCND/CDK4*, *CDK6* són els encarregats d'inactivar per fosforilació a *RB1*, el qual és l'encarregat de reprimir *P16^{ink4a}*, per tant, es dona un procés de retroalimentació en el qual els complexos *CCND/CDK4,6* són inhibits un cop *RB1* s'ha inactivat per fosforilació. Per altra banda, la variant alternativa de *splicing*, *ARF*, és un gen que té un paper estabilitzador del TSG *TP53* i pot interactuar i segrestar *MDM2* que és una proteïna responsable de la degradació de *TP53*. *P16^{ink4a}/ARF* gen està inactivat mitjançant mutacions, delecions i hipermetilació en un gran nombre de tumors humans i es considera un TSG molt important donat que la pèrdua del locus *P16^{ink4a}/ARF* implica la inactivació de dues vies *p16-CDK4,6-RB* i *ARF-MDM2-TP53* de manera simultània.

RB1: El gen del retinoblastoma es troba al locus 13q14. Codifica per una proteïna que intervé en la fase G1 tardana, prevenint la inapropiada entrada en fase S. Aquesta forma part d'una família de proteïnes anomenades *pocket-protein*¹⁵, que inclou també les proteïnes P107 i P130. Aquestes tres proteïnes presenten una gran homologia estructural i poden interactuar amb factors de transcripció de la família E2F fent efecte en els nivells de proliferació.

La importància de la regulació de RB1 sobre E2F radica en el fet que una gran part de promotors que controlen gens implicats en la proliferació cel·lular, com són els proto-oncogens (*MYC, C-MYB, CCNA, CCNE i CCND1, CDC2*), i gens involucrats en la replicació, etc. presenten seqüències d'unió per aquest factor de transcripció. El segrest de E2F implicaria la no activació de la transcripció de tot aquest conjunt de gens necessaris per a la progressió al llarg del cicle cel·lular. La pèrdua del gen o l'alteració funcional de la proteïna és molt freqüent en una gran varietat de tumors, suggerint que RB1 pot tenir un paper molt important en la regulació de la proliferació cel·lular.

El reconeixement i reparació del dany al DNA és un procés complex que implica un gran nombre de proteïnes. L'elevat nombre d'alteracions cromosòmiques i de cariotips complexos detectat en gran part dels tumors humans suggereix que aquests presenten algun tipus d'alteració de les vies de resposta al dany i per tant l'alteració d'aquests mecanismes de reparació pot constituir un important mecanisme patogenètic en la formació de tumors. Alguns exemples de gens implicats en aquestes vies són:

ATM: El gen *ATM* codifica per a un fosfoproteïna quinasa que pertany a la superfamília Fosfatidilinositol 3-quinasa (PIK3) i està localitzat a 11q22.3. És regulador mitjançant fosforilació, d'un gran nombre de proteïnes, incloent proteïnes supressores de tumors com TP53 i BRCA1, quinases de control com CHK2, proteïnes de control com RAD17 i RAD9, i proteïnes de reparació com NBS1. ATM està estretament relacionada amb una altra quinasa anomenada ATR i totes dues estan considerades les principals controladores de les vies de control del cicle cel·lular necessàries per a l'estabilitat del genoma i la resposta al dany del DNA, com per exemple, detectant els trencaments de doble cadena (DSB). Les mutacions d'aquest gen estan relacionades amb un desordre autosòmic recessiu anomenat Ataxia Telangiectasia (AT); les cèl·lules AT presenten inestabilitat cromosòmica i defectes en la resposta a radiació. Les mutacions i delecions del gen *ATM* també s'han trobat en diferents neoplàsies sobretot limfoides.

ATR: *ATR* està localitzat a la banda cromosòmica 3q23. La proteïna codificada pel gen *ATR* és també una quinasa de la família de PIK3/PIK4. Presenta similituds amb la proteïna RAD3 de *Schizosaccharomyces pombe*¹⁶, la qual realitza el control de cicle cel·lular necessari per a l'aturada del cicle cel·lular i per a la reparació del DNA en resposta a dany. Aquesta quinasa fosforila CHK1, les proteïnes de control RAD17, i RAD9, i proteïnes supressores de tumors com BRCA1. Les mutacions d'aquest gen estan associades a la Síndrome de Seckel.

BRCA1: Aquest gen codifica per una fosfoproteïna nuclear que juga un paper important en el manteniment de l'estabilitat genòmica i actua com a TSG. La proteïna que codifica forma part d'un complex d'unió amb altres TSGs, sensors de dany a DNA etc. anomenat BASC. Aquesta proteïna juga un paper important en la transcripció, la reparació dels trencaments de doble cadena i la recombinació. Mutacions d'aquest gen són les causants del 40% dels cancers de mama hereditaris i de més d'un 80% dels cancers de mama i ovari hereditaris.

CHK1/CHK2: Els gens *CHK1* i *CHK2* estan localitzats a les regions cromosòmiques 11q24.2 i 22q12.1 respectivament. Són dos quinases que actuen *downstream*¹⁷ d'ATM i que eviten la progressió del cicle cel·lular en resposta a l'activació d'ATM i ATR en una situació de dany al DNA. CHK1 activada per fosforilació actua regulant diferents substractes com per exemple TP53 i CDC25 promovent el segrest del cicle a G1/S i G2/M. S'han descrit mutacions de *CHK1* en alguns carcinomes d'endometri, colorectals i d'estómac. Per altra banda, *CHK2* fou considerat un nou gen supressor de tumors en identificar-se mutacions germinals en una sèries de famílies amb la Síndrome de Li-Fraumeni. Malgrat tot, només s'han pogut identificar de forma ocasional mutacions somàtiques en tumors esporàdics.

FANCC: Aquest gen està localitzat a a 9q22.3 i codifica per una proteïna que retrassa l'aparició de l'apoptosi i promou la recombinació homòloga com a mecanisme de reparació del dany al DNA. Les mutacions d'aquest gen estan associades a l'anèmia de Fanconi, una síndrome de fragilitat cromosòmica, caracteritzat per presentar malformacions congènites, insuficiència medul·lar progressiva i predisposició a desenvolupament de leucèmies i tumors sòlids.

Inestabilitat genètica

Definim inestabilitat com la taxa de canvis genètics que es produeix en un període de temps, malgrat tot, sovint es simplifica com la mesura de la inestabilitat el nivell

d'alteracions genètiques que es troba a les cèl·lules en un moment determinat. (Gisselsson, 2003) És possible diferenciar entre dos tipus d'inestabilitat, la inestabilitat de microsatèl·lits i la inestabilitat cromosòmica.

Inestabilitat cromosòmica

El fenomen de la inestabilitat cromosòmica és una característica comú de les neoplàsies malignes i implica una adquisició d'anomalies cromosòmiques, tant de tipus numèric (també variacions de la ploidia) com estructural, i està influenciat per la naturalesa del tumor. Alguns tumors desenvolupen mecanismes que promouen l'aparició de molts reordenaments entre cromosomes, mentre que d'altres desenvolupen mecanismes que confereixen pocs canvis cromosòmics, de manera que el resultat són diferents taxes d'evolució cromosòmica. Per tal d'obtenir aquesta visió global de la inestabilitat genòmica i de la complexitat cromosòmica és necessària la combinació de diferents eines citogenètiques que detectin totes les alteracions, tant les numèriques com les estructurals.

Existeixen diferents maneres de valorar la inestabilitat genètica; per una banda es pot mesurar el grau d'heterogeneïtat genètica que s'ha donat en una població cel·lular després de X generacions, malgrat que d'aquesta manera no es detecten els canvis que són negatius, sinó simplement aquells que són seleccionats favorablement.

Altres estudis opten per l'estudi de la **variabilitat en el nombre modal**¹⁸ que consisteix en calcular el percentatge de cèl·lules que presenten un nombre de cromosomes diferent al nombre modal, o per la quantificació dels canvis cromosòmics inestables, és a dir, aquells que es veuen únicament en una metafase mitjançant l'estudi de la **variabilitat d'alteracions estructurals no-clonals**, calculant el nombre d'alteracions estructurals no-clonals¹⁹ per cèl·lula estudiada.(Camps et al., 2004)

Inestabilitat de microsatèl·lits

La inestabilitat de microsatèl·lits²⁰ és un fenomen minoritari descrit en càncer de Colon minoritari sense poliposi.(Bhattacharyya et al., 1994) Està causada per la inactivació d'alguns dels components de la maquinaria de la reparació. La falta de reparació dona lloc a una acumulació de canvis nucleotídics que es localitzen en les regions repetitives o de microsatèl·lits. Aquesta inestabilitat a nivell de la seqüència de DNA pot provocar que es produeixin mutacions en gens implicats en el procés tumoral. Les neoplàsies que

presenten aquest fenomen acostumen a no presentar gran nombre de reorganitzacions cromosòmiques i/o alteracions numèriques.

Mecanismes generadors d'inestabilitat

La variabilitat en el tipus d'alteracions genètiques que s'acumulen durant el procés tumoral suggereix l'existència de diversos mecanismes que provoquen l'aparició d'aquestes. Alguns dels mecanismes poden ser trencaments de doble cadena en punts fràgils del cromosoma o bé un escurçament de les seqüències que formen els telòmers.

Punts fràgils

Existeixen diferents mecanismes que poden donar lloc a trencaments de doble cadena; els més importants són: una aturada a la força de replicació, la formació d'un trencament de doble cadena a partir d'un de cadena simple o bé un trencament de les cromàtides durant la separació anafàsica.(Freudenreich, 2007) Els punts fràgils comuns (CFS) són regions que exhibeixen una freqüència elevada de trencaments, tinció dèbil i constriccions quan els cromosomes són exposats a agents que inhibeixen una inhibició parcialment de la replicació del DNA. Són signes d'inestabilitat genòmica que es troben en tots els individus i que són *hot spots*²¹ per reorganitzacions de material i delecions. Aquests punts cromosòmics es trenquen induïts per agents clastogènics (Afidicolina, folat, timidilat, 5-azacitidina i bromo-deoxiuridina, etc.) tot i que l'hipoxia també pot causar aquest tipus de trencaments. Els CFS més freqüents són FRAD2G (2q31), FRA3B (3p14.2), FRA6E (6q26), FRA7H (7q32.3), FRA16D (16q23.2) i FRAXB (Xp22.3), mentre que resta de CFS tenen una freqüència menor (**Figura 7**).(Smith et al., 2007;Durkin & Glover, 2007)

L'interès científic dels CFS es troba en el fet que aquests punts fràgils correlacionen de manera significativa amb els punts de trencament que donen lloc a translocacions o llocs on es dona delecions de material en moltes neoplàsies. De la mateixa manera, molts oncogens estan situats propers a punts fràgils i la mida de les amplificacions està correlacionada amb la distància entre dos punts fràgils.(Durkin & Glover, 2007)

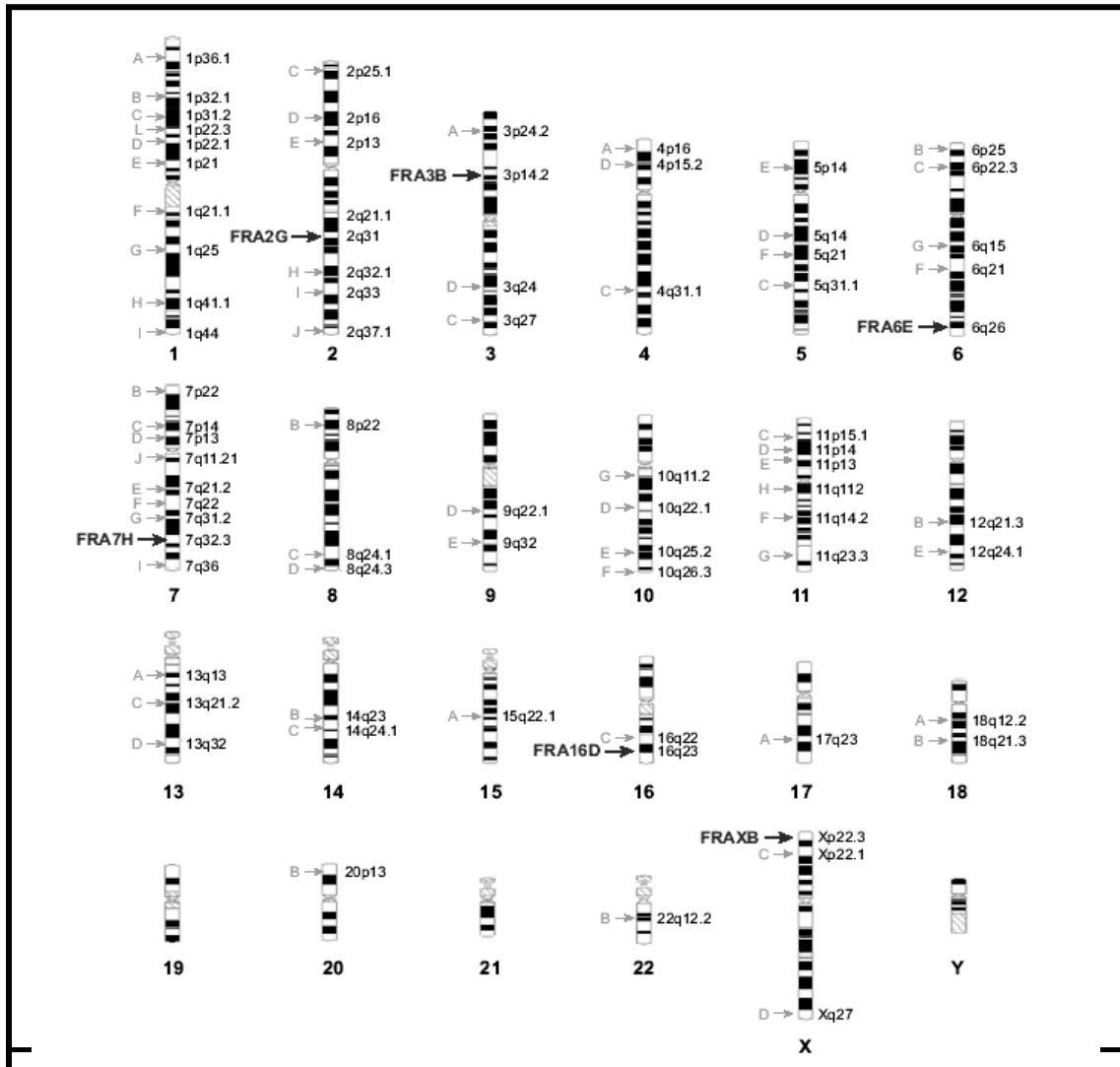


Figura 7. Localització dels punts fràgils més comuns (FRA) i d'altres de menys freqüència.

Escurçament de les seqüències telomèriques

Un altre mecanisme d'inducció de la inestabilitat és l'escurçament de les seqüències telomèriques dels cromosomes. A cada cicle cel·lular les cèl·lules perden petits fragments de la seqüència que configura el telòmer. Quan aquesta seqüència és massa curta no es poden unir les proteïnes encarregades de la protecció de la cadena de DNA, es produeix una desestabilització del cromosoma i es promouen associacions amb algun extrem lliure proper ja sigui d'un altre cromosoma com de la cromàtida germana. Això implica problemes durant l'anafase que poden acabar generant trencaments de doble cadena o bé un citocinesi fallida que podria donar lloc a cèl·lules tetraploides.

Tècniques citogenètiques i moleculars

Citogenètica Convencional (CC)

Com s'ha introduït a l'apartat **El cromosoma i el cariotip humà** d'aquesta tesi, La CC és una tècnica citogenètica d'ús molt estès que consisteix en la tinció de metafases (amb colorant Giemsa) obtingudes a partir d'extensions cromosòmiques de cèl·lules en cultiu que permetent distingir els cromosomes mitjançant un bandejat diferencial (patró de bandes G) que divideix els cromosomes en unes 400 bandes. Les regions i bandes són numerades de manera consecutiva des del centròmer fins a cadascun dels dos extrems dels braços. La CC presenta l'avantatge de poder confirmar el diagnòstic realitzant un seguiment de la malaltia residual si en el moment del diagnòstic s'ha detectat un marcador citogenètic determinat. En el cas de les leucèmies i els limfomes s'estudien les cèl·lules dels teixits implicats, normalment aspirats de moll d'ós, i extraccions de sang perifèrica i en el cas dels limfomes el gangli limfàtic. Tant els limfomes com les leucèmies presenten poca eficàcia en el cultiu quan tenen un índex de proliferació baix, a més a més els limfòcits B tenen una resposta als mitògens relativament baixa, és per això que de forma ordinària s'afegeix algun agent mitogen²² (TPA, TNF, IL2, PK, entre d'altres), que estimula el creixement de les cèl·lules tumorals i en conseqüència ajuda a detectar amb major freqüència els cariotips anòmals. En l'actualitat el mitogen més específic de limfòcits B és l'acetat de Miristat de Tetraforbol (TPA).

Hibridació in situ fluorescent (FISH)

La tècnica de FISH permet la detecció o localització de seqüències específiques de DNA sobre cromosomes metafàsics i nuclis interfàsics utilitzant sondes específiques marcades amb un fluorocrom específic. Existeixen diferents tipus de sondes: **Sondes centromèriques:** Hibriden específicament amb el centròmer de cada cromosoma. S'utilitzen en la detecció d'alteracions numèriques: monosomies i trisomies.

Sondes locus específiques: Són utilitzades en la detecció d'un locus específic en el conjunt cromosòmic d'una metafase per tal de poder determinar si s'ha produït algun tipus d'anomalia numèrica o estructural que inclogui aquest locus.

Sondes de pintat cromosòmic: Són sondes que permeten el marcatge de tot un cromosoma sencer amb un fluorocrom. S'utilitzen per elucidar anomalies estructurals

que donen lloc a cromosomes marcadors de difícil identificació. Aquestes sondes no s'utilitzen sobre nuclis interfàsics.

Sondes de fusió específiques de translocació: permetent detectar la presència o no d'una translocació mitjançant la detecció de la senyal de fusió superposant els marcatges fluorescents dels dos *partners*²³ implicats.

Darrerament, la utilització de la tècnica de FISH, també ha permès avançar en la recerca de la inestabilitat genòmica mitjançant la utilització de sondes de FISH de marcatge telomèric que permeten valorar la longitud telomèrica dels cromosomes de la cèl·lula neoplàsica. Aquestes sondes telomèriques estan constituïdes per seqüències complementàries a les seqüències de DNA altament conservades que es repeteixen en tàndem (TTAGGG) i que constitueixen els telòmers. Aquestes sondes permeten detectar la presència o absència de telòmers així com quantificar-los.

Multicolor FISH (M-FISH)/Spectral Karyotyping (SKY)

La introducció en els darrers anys de la tècnica de **M-FISH/SKY** ha suposat un gran canvi en el món de la citogenètica. Aquesta tècnica, basada en la identificació de 24 sondes de FISH hibridades simultàniament, permet detectar canvis numèrics i estructurals sobre extensions metafàsiques de cultius cel·lulars. (Schrock et al., 1996; Speicher et al., 1996)

Es marquen els 22 cromosomes autosòmics i els 2 sexuals amb diferents combinacions de cinc sondes: una verda, dues vermelles i dues infraroges. que donen un color característic i un espectre d'emissió de fluorescència que serveix per diferenciar cada parell de cromosomes de la resta. Per tal d'obtenir 24 combinacions diferents es realitzarien combinacions de 5 elements de tres en tres (10 combinacions), de dos en dos (10 combinacions), i de un en un (5 combinacions), sense repetició obtenint un total de 25 possibles colors ($C_3^5 + C_2^5 + C_1^5 = 25$) (**Figura 8**). L'anàlisi es realitza amb un microscopi de fluorescència i un programa informàtic específic que realitza una classificació algorítmica assignant un color a cada cromosoma. Permet detectar translocacions intercromosòmiques i identificar cromosomes marcadors d'origen desconegut per citogenètica convencional però té les seves limitacions en la detecció de microdelecions o microinsercions, inversions i també a l'hora de definir els punts exactes de trencament. Tampoc permet la diferenciació del braç p i q de cada cromosoma.

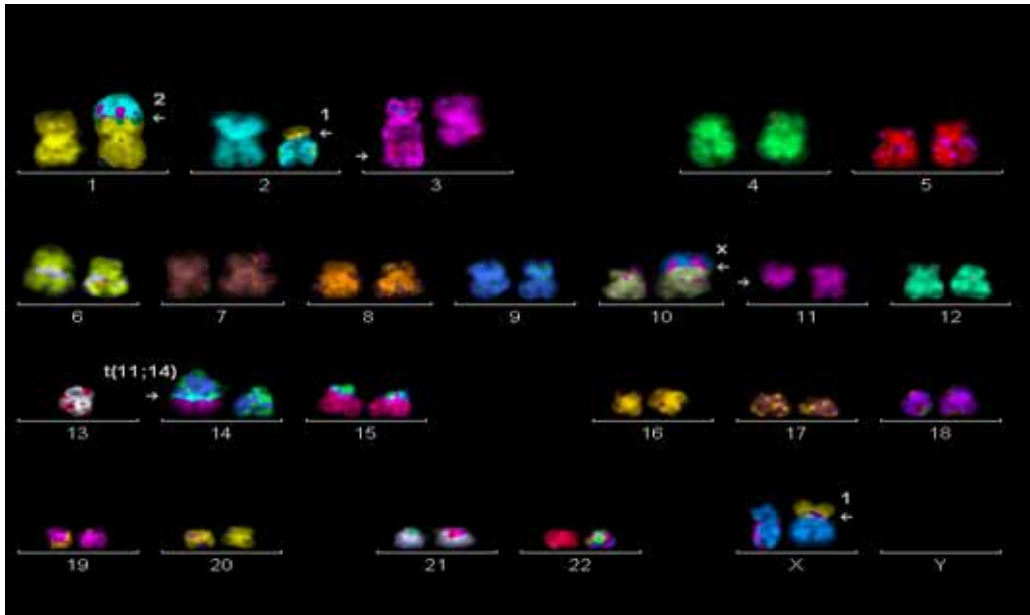


Figura 8. Cariotip d'un tumor humà utilitzant M-FISH

Recentment, s'ha descrit una variant del M-FISH, anomenat **combinatorial binary ratio labelling (COBRA) FISH** que permet augmentar la multiplicitat del M-FISH. (Tanke et al., 1999) En comptes d'afegir un fluorocrom més, que dificultaria la detecció degut al solapament de l'efecte d'emissió i implicaria un augment en el temps d'exposició de la mostra, el mètode es basa específicament en l'ús simultani de marcatge combinatori i marcatge binari (també anomenat *ratio labelling*). Es tracta d'introduir un marcatge binari a un marcatge inicial en el qual s'han obtingut 12 colors mitjançant la combinació de tres fluorocroms. D'aquesta manera en afegir al marcatge inicial amb una quart fluorocrom sonda dupliquem el nombre de sondes fins a 24. Amb un segon marcatge binari obtindríem fins a 48 combinacions. Aquest potencial addicional ha estat aplicat en la diferenciació dels braços p i q dels cromosomes de manera que la tècnica de COBRA-FISH presenta una millora substancial respecte el M-FISH i permetent detectar inversions i translocacions intracromosòmiques. (Wiegant et al., 2000)

RX-FISH

El RX-FISH o Harlequin-FISH és una tècnica citogenètica que permet visualitzar i analitzar cromosomes bandejats en colors sobre extensions metafàsiques de cultius cel·lulars. La seva resolució és baixa en comparació amb les bandes G, donat que bandeja els cromosomes en 80-90 bandes per cariotip haploid. El conjunt de sondes es sintetitza a partir de DNA de Gibó²⁴ el qual presenta un alt grau d'homologia amb el

DNA humà i uns cromosomes altament fragmentats (degut a les translocacions que presenta); d'aquesta manera permet obtenir fàcilment 100 fragments cromosòmics diferents, els quals marquen amb tres fluorocroms diferents, generant per combinació set colors.(Muller et al., 1997)

La tècnica de RX-FISH permet detectar translocacions intercromosòmiques, inversions intracromosòmiques, visualitzar amb major precisió els punts de trencament, detectar anomalies críptiques, així com diferenciar les delecions intersticials de les terminals. Aquesta tècnica és molt utilitzada a l'estudi de l'evolució del cariotip humà per detectar inversions cromosòmiques donat que sembla ser que aquest fenomen és un dels mecanismes més freqüents en processos evolutius.

Hibridació Genòmica comparada (CGH)

La CGH és un mètode d'anàlisi citogenètic-molecular que permet detectar guanys i pèrdues de regions cromosòmiques. Es basa en la hibridació sobre extensions cromosòmiques normals de dos DNAs marcats amb diferents fluorocroms, un de normal i l'altre de tumoral (material que es vol analitzar).(Kallioniemi et al., 1993) Si algunes regions estan guanyades o perdudes en el tumor resulten en la detecció d'una fluorescència més intensa del fluorocrom verd (en el cas de guanys en el tumor) o del fluorocrom vermell (en el cas de pèrdues en el tumor) (**Figura 9**). La CGH dona una visió global del nombre d'alteracions numèriques del tumor (tant de guany, amplificacions, com de pèrdues cromosòmiques). La tècnica de CGH combina les bases de la tècnica de FISH (complementarietat entre cadenes homòlogues de DNA) i l'anàlisi d'imatge quantitatiu (nivells de fluorescència) amb la diferència que a la CGH s'hibrida el DNA genòmic tumoral amb alteracions desconegudes sobre metafases normals, a diferència del FISH en el qual s'hibriden sondes de DNA marcades amb un fluorocrom sobre metafases o nuclis interfàsics tumorals. Mitjançant la utilització d'un equip i d'un software adequats es realitza una comparació de les intensitats de la fluorescència de cadascun dels dos DNAs marcats i hibridats sobre els cromosomes de manera que es detecten les alteracions del DNA tumoral en qüestió.

S'han realitzat molts estudis per tal de determinar la mida mínima d'un segment cromosòmic alterat detectable per CGH i s'ha establert que la sensibilitat de la CGH es troba al voltant de les 3-5 Mb i d'unes 2Mb en el cas de les amplificacions d'alt nivell que es trobin en més de 20 còpies.(Bentz et al., 1998;Kirchhoff et al., 1999;Brecevic et al., 2001)

Els avantatges d'aquesta tècnica respecte altres tècniques citogenètiques és la possibilitat de treballar únicament amb DNA, de manera que resulta molt útil en la detecció de guanys i pèrdues de material en casos amb malalties hematològiques o tumors sòlids que presenten poca proliferació i en els que obtenir cèl·lules en divisió a vegades és difícil. La CGH també resulta de gran utilitat en la identificació d'amplificacions que podrien ser dianes de oncogens potencials o bé de pèrdues de material genètic que podrien contenir TSGs. D'aquesta manera en un sol experiment obtenim una visió global de les anomalies en tots els cromosomes del genoma humà sense tenir cèl·lules en divisió. Finalment resulta molt útil per a l'anàlisi de casos que per CC s'observa un cariotip complex amb canvis de ploidia o cromosomes marcadors amb material extra no identificat.

La desavantatge principal però de la CGH és que no dona informació de translocacions equilibrades, inversions, i reorganitzacions cromosòmiques petites donat que només detecta aquells canvis que afecten al contingut global de DNA d'una cèl·lula. Tampoc pot determinar la ploidia dels tumors analitzats donat que en aquests casos la relació de fluorescència del tumor respecte al normal no varia, per tant en els casos que es vulgui determinar si aquests tumors són triploids, tetraploids, etc. serà necessària la realització d'un cultiu cel·lular o en el cas de només disposar de DNA d'una anàlisi per citometria de flux (FC). Tot i així la sensibilitat de la CGH pot variar molt en funció de la ploidia del tumor que s'estudia, és a dir no és el mateix estudiar un tumor diploid que un tumor tetraploid. En un cas diploid una pèrdua de material significa l'absència de la meitat del material original (50%) mentre que en el cas d'un tumor tetraploid que presenti una pèrdua de material, aquesta pèrdua només significarà un 25% del material que presenta. Un altre punt a tenir en compte és la possible contaminació del DNA tumoral amb cèl·lules normals la qual podria diluir les alteracions presents en el tumor i per tant comportar una infravaloració de les d'aquestes. La tècnica de CGH requereix com a mínim un 25% de cèl·lules tumorals a la mostra estudiada (Larsen et al., 1999) és per això que en alguns estudis en els que no es disposava de suficient material s'ha realitzat microdissecció amb una posterior amplificació del genoma mitjançant DOP-PCR (Daigo et al., 2001; Hirose et al., 2001) Aquest mètode permet l'estudi de diferents àrees d'un mateix tumor (i fins i tot de cèl·lules concretes) per tal d'estudiar l'heterogeneïtat intratumoral i també augmentar la quantitat de DNA extret en tumors inclosos en parafina.

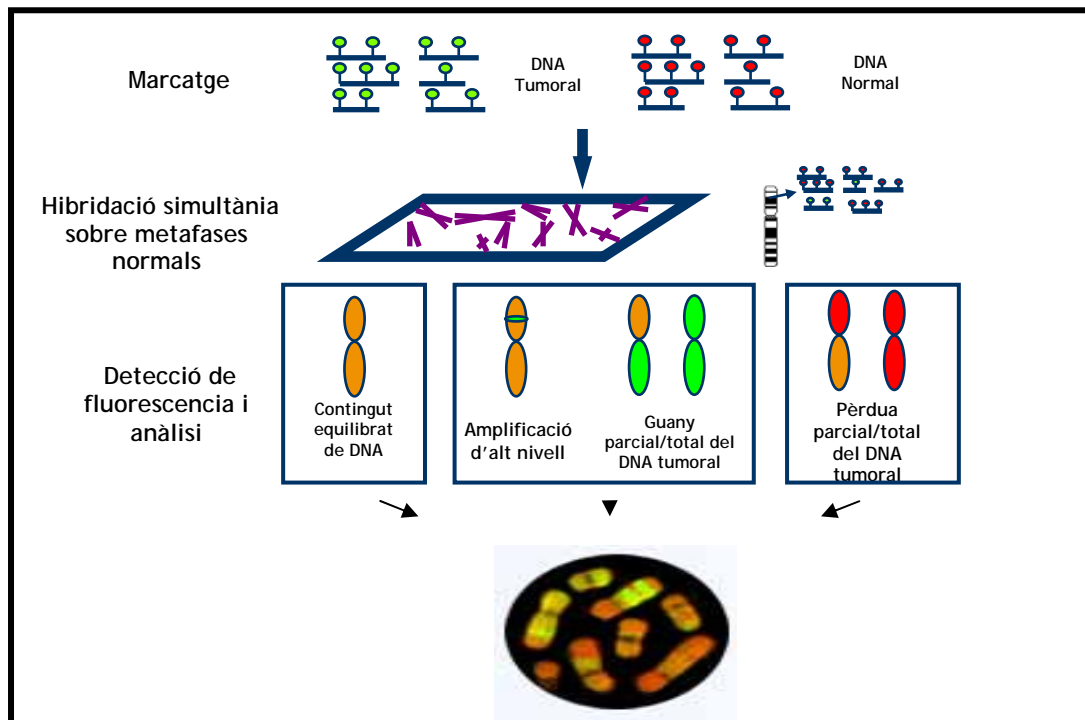


Figura 9. Esquema de la tècnica de CGH

Microarrays

El principi dels microarrays es fonamenta en l'habilitat dels fragments d'àcids nucleics de cadena simple d'hibridar de manera altament específica amb una segona cadena que conté la seqüència complementària, generant d'aquesta manera molècules de doble cadena. Els microarrays estan formats per una matriu sòlida sobre la qual s'ordenen milers de fragments d'àcids nucleics. La mostra (DNA, RNA o cDNA) es marca utilitzant fluorescència i s'hibrida sobre la superfície de l'array.

Després d'una sèrie de rentats, el complex mostra-sonda, entenent com a sonda l'array hibridat, es manté unit de manera que la quantitat de mostra hibridada sobre la sonda es quantifica mitjançant sistemes de detecció fluorescent. Aquesta tecnologia permet l'anàlisi simultani de milers de variables en un sol experiment de manera ràpida i eficient.

CGH array

Aquesta tècnica, de la mateixa manera que la CGH metafàsica, permet detectar guanys i pèrdues de material genètic, mitjançant la competència en la hibridació de material tumoral *versus* normal sobre impressions de BACs²⁵ que contenen seqüències de DNA en una matriu sòlida (portaobjectes). Es poden detectar guanys i pèrdues de material

genètic a nivell general de tot el genoma o bé de regions concretes o de gens concrets, sempre en funció del disseny de l'array (**Figura 10**).

Els avantatges que aporta aquesta tècnica respecte a la CGH metafàsica són: un augment de la resolució, permetent detectar guanys i pèrdues de regions puntuals no detectables per CGH metafàsica i l'optimització de la quantitat necessària de DNA per cada hibridació. Tampoc requereix cariotipatge i es realitza una sola captura de l'imatge amb dos filtres, a diferència de les múltiples captures que són necessàries en la CGH. Una altra millora considerable respecte la tècnica anterior és que permet valorar les regions pericentromèriques i els cromosomes més petits, difícilment estudiades per la CGH metafàsica. També ens permet una millor correlació amb les dades d'expressió, facilitant la identificació dels gens que poden estar implicats directament en la patogènesi del tumor (Oncogens amplificats, i sobre-expressats i TSGs perduts i infra-expressats).

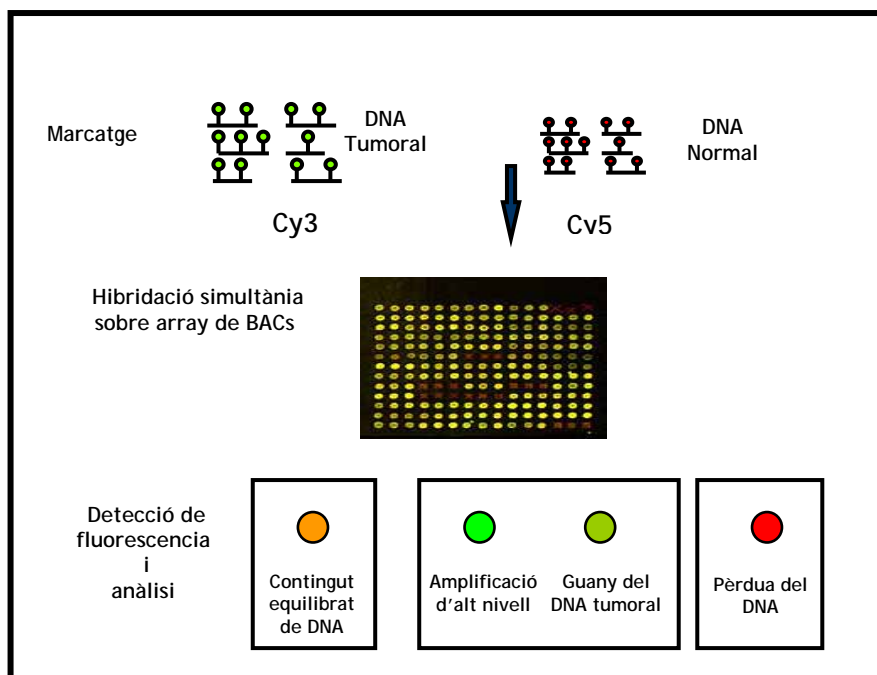


Figura 10. Esquema de la tècnica de CGH arrays.

SNP array

El SNP array és un tipus d'array de DNA que s'utilitza per detectar polimorfismes d'una població. Un SNP es la variació més comú en el genoma. Existeixen entre 5-10 milions de SNPs en el genoma. Els SNPs estan altament conservats en l'evolució i dins la població i són un excel·lent marcador genotípic. Els principis bàsics d'aquesta tècnica són molt similars als de CGH arrays. L'array conté seqüències immobilitzades d'àcids

nucleics de cadena curta (oligonucleòtids de 25 pb) i cada SNP de l'array és interrogat per la sonda (250 ng del material en qüestió). Aquesta tècnica és molt útil en l'estudi del genoma, per exemple en la determinació de susceptibilitat a determinades malalties i té la seva aplicació en estudis farmacogenètics mesurant l'eficiència de drogues terapèutiques específiques per a cada individu. Els SNP arrays també tenen la seva aplicació en estudis de LOH. La pèrdua d'heterozigositat és un desequilibri de la forma al·lèlica que es pot donar per la completa pèrdua d'un al·lel o per un augment en el nombre de còpies d'un dels dos al·lells i pèrdua de l'altre. La utilització d'un SNP array d'alta densitat per detectar LOH permet la identificació del patró de desequilibri al·lèlic amb un potencial pronòstic i diagnòstic. L'ús dels SNP arrays té un gran potencial en el diagnòstic del càncer donat que el fenomen de LOH és una característica prominent en molts tipus de càncer. (Mei et al., 2000)

A banda del genotipat, la intensitat de la senyal d'hibridació proporciona informació sobre el nombre de còpies dels segments cromosòmics mitjançant la comparació d'aquestes intensitats amb les de pacients sans de diverses ètnies utilitzats com a control. Per tal de realitzar aquest anàlisi existeixen eines específiques com Chromosome Copy Number Analysis Tool (CNAT). La resolució en aquest anàlisi de nombre de còpies és troba entre 25 kb i 5 kb en funció de la plataforma utilitzada.

Microarrays d'expressió

A banda de les alteracions genètiques, els estudis de l'expressió genètica són necessaris per a conèixer el comportament dels gens a la cèl·lula tumoral. És per això que s'han creat plataformes d'expressió en microarrays. De la mateixa manera que amb la CGH array, en els arrays d'expressió, el material (RNA o cDNA) es marca amb fluorescència o radioactivitat i s'hibrida sobre una matriu sòlida. D'aquesta manera aquest mètode permet quantificar la quantitat d'expressió és a dir de RNA que existeix de cadascuna de les regions del genoma interrogades. Aquesta tecnologia està produint grans avenços en la definició de perfils d'expressió específics associats a categories diagnòstiques ja conegudes, en el descobriment de noves entitats o tipus tumorals, en l'establiment de nous paràmetres a nivell pronòstic, en el reconeixement de nous mecanismes patogenètics i està possibilitant la identificació de noves dianes terapèutiques en relació a les alteracions moleculars bàsiques de la neoplàsia.

Actualment, existeixen algunes plataformes que han seleccionat gens específics implicats en la patogenèsi d'algun tipus de malaltia permetent d'una manera més precisa

conèixer els nivells d'expressió d'aquests gens diana. Un exemple és la fabricació de la plataforma Lymphochip cDNA microarrays, que va ser creada l'any 2000 per a determinar el perfil d'expressió de neoplàsies limfoides i darrerament ha estat validada en diverses series de limfomes humans. (Alizadeh et al., 2000; Rosenwald et al., 2003b; Dave et al., 2004; Dave et al., 2006) El Lymphochip està compost de 18.500 clons de cDNA i està enriquit en gens que estan expressats en els limfòcits. (Alizadeh et al., 2000)

PCR quantitativa

La *Polimerase chain reaction* PCR²⁶ quantitativa o en temps real (RQ-PCR) es realitza mitjançant un equip que integra una PCR convencional i un espectrofluorímetre que determina la fluorescència que es produeix en el tub d'amplificació en tot moment al llarg del procés. El fluoròfor està present constantment en el mitjà de la reacció i el senyal obtingut al final de cada cicle d'amplificació es representa en una gràfica davant del nombre de cicles obtenint-se una corba que mostra el transcurs del procés. La càmera és multicanal, fet que permet dur a terme diverses anàlisis simultànies en el mateix tub de PCR. La quantificació s'assoleix mitjançant l'ocupació d'una corba patró en la qual es representen les intensitats de fluorescència aconseguides davant concentracions inicials conegudes d'un fragment idèntic que volem quantificar. La química que s'utilitza en la detecció és o la tecnologia de les sondes marcades fluorescentment, anomenades sondes TaqMan, o bé *SYBR Green* com a agent intercalant.

Neoplàsies limfoides

Les neoplàsies limfoides són un grup de neoplàsies molt heterogeni, entenen com a neoplàsia qualsevol procés que impliqui proliferació excessiva. Aquesta diversitat és deguda a la complexitat a nivell funcional i cel·lular de les diferents poblacions de sistema immunitari i a l'heterogeneïtat dels mecanismes patogenètics que poden originar el desenvolupament i progressió de la malaltia.

Anomenem limfoma a tota neoplàsia que es dona en el sistema limfàtic. La presència d'un limfoma implica que les cèl·lules del sistema limfàtic es reproduïxin de forma anormal i amb el temps impedeixen que l'organisme pugui combatre les infeccions de forma adequada.

Classificació dels limfomes

Els NHL estan classificats com limfomes de cèl·lula B o limfomes de cèl·lula T en funció de la línia de limfòcit que inicia el procés tumoral. Els limfomes de cèl·lula B presenten aproximadament el 90% dels NHL mentre que els limfomes de cèl·lula T es troben només en un 10% dels casos. L'expressió dels antígens de superfície i de immunoglobulines (Ig) depèn del tipus de limfòcit i de l'estadi de diferenciació o maduració. L'anàlisi d'aquestes proteïnes de superfície és molt útil per determinar l'histogènesi del tumor. (Figura 11, Taula 1).

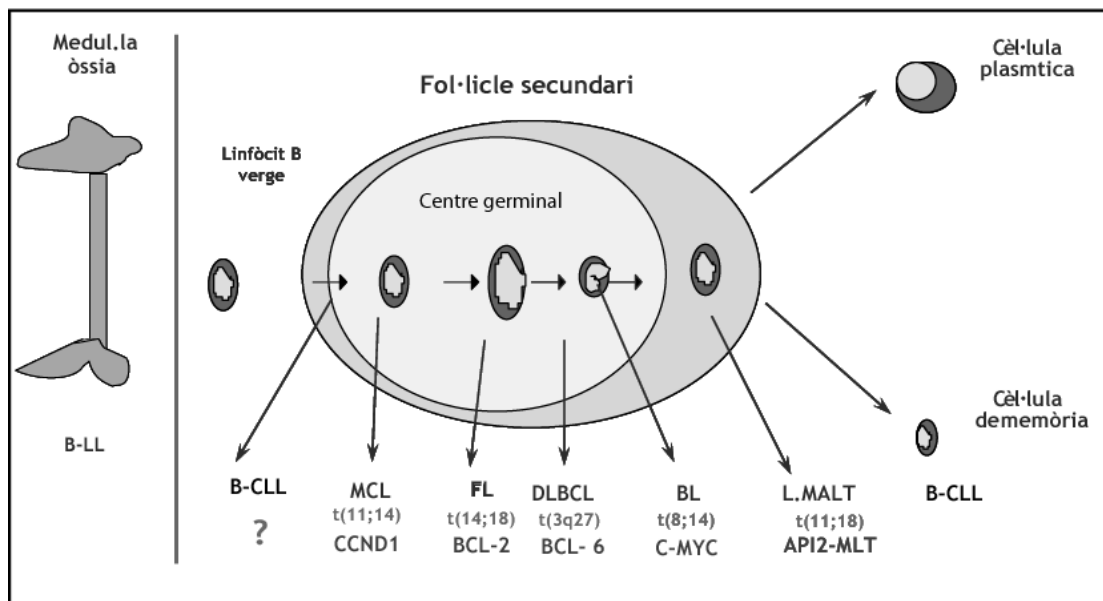


Figura 11. Model d'histogènesi d'alguns NHL

Taula 1. Classificació de les neoplàsies limfoides segons la WHO (Jaffe et al., 2001)**NEOPLÀSIES DE CÈL·LULA B PRECURSORA****Leucèmia /Limfoma limfoblàstic (B-LL)****NEOPLÀSIES DE CÈL·LULA B MADURA****Leucèmia limfàtica crònica (B-CLL)****Leucèmia prolimfocítica de cèl·lula B (B-PLL)****Limfoma limfoplasmocític (LLP)****Limfoma esplènic (SMZL) i ganglionar (NMZL) de la zona marginal****Limfoma fol·licular (FL)****Tricoleucèmia (HCL)****Mieloma de cèl·lula plasmàtica o mieloma múltiple (MM)**

Gammopatia monoclonal de significació indeterminada (MGUS)

Plasmacitoma solitari de l'òs

Plasmacitoma extraossi

Amilodiosi primària

Malalties de la cadena pesada

Limfoma B de la zona marginal associat a mucosa (MALT-Lymphoma)**Limfoma difús de cèl·lules grans (DLBCL)****Limfoma B primari mediastínic (PMBCL)****Limfoma de cèl·lules del mantell (MCL)****Limfoma B intravascular (IVL)****Limfoma d'efusió primària (PEL)****Limfoma Burkitt (BL)****NEOPLÀSIES DE CÈL·LULA T PRECURSORS****Leucèmia limfocítica de precursor T (T-ALL)****NEOPLÀSIES DE CÈL·LULA T PERIFÈRICA o NK****Leucèmia prolimfocítica de cèl·lula T (T-PLL)****Leucèmia limfocítica de cèl·lules grans granulars: Tipus T (T-LGL)**

Leucèmia de cèl·lula NK agressiva

Leucèmia de cèl·lula T d'adults (ATLL)**Micosis fungoides****Síndrome de Zézary**

Limfoma primari cutani anaplàsic de cèl·lules grans

Papulosis limfomatoide
 Limfoma extra ganglionar de cèl·lula NK/T de tipus nasal
 Limfoma T de tipus enteropàtic
 Limfoma T hepatosplenic
 Limfoma T subcutani paniculitis-like
 Limfoma T angioimmunoblàstic
Limfoma perifèric de cèl·lules T, no especificat (PTCL-U)
Limfoma anaplàstic de cèl·lules grans (ALCL)
 Limfoma NK blàstic

Les neoplàsies limfoides marcades en negreta són explicades de forma extensa en aquesta introducció.

Els limfomes de cèl·lules B

Els limfomes B són un conjunt de proliferacions clonals de cèl·lula B que es troben en diferents estadis de diferenciació (Des de cèl·lules verges a cèl·lules plasmàtiques madures) A nivell mundial, formen un 90% de les neoplàsies limfoides i provoquen un 4% dels càncers. Es caracteritzen per expressar una sèrie d'antígens propis de les cèl·lules B (CD19, CD20, CD22 i CD79) i altres marcadors, com són les Ig de superfície que tenen com a funció el reconeixement de l'antigen durant la resposta immune, a diferència de la cèl·lula T que reconeix mitjançant una estructura especialitzada anomenada receptor de cèl·lula T (TCR)²⁷.

Limfoma de cèl·lula B precursora

Limfoma limfoblàstic (B-LL)

B-LL és una neoplàsia de limfoblasts típicament composta de blasts de tipus B de mida petita-mitjana amb afectació de moll d'os i sang. És una malaltia poc comú i que bàsicament afecta a nens (75% dels casos). El pronòstic és en general bo i en pacients pediàtrics es dona una remissió de fins a un 95% i d'un 60-85% en adults.

Limfoma de cèl·lula B perifèric

Leucèmia limfàtica crònica /Limfoma limfocític de cèl·lula petita (B-CLL)

És un limfoma de baix grau que es caracteritza per l'acumulació de cèl·lules B monoclonals que semblen limfòcits madurs petits. El patró immunohistoquímic presenta expressió de forma usual de CD5 i CD23 i el seu curs clínic és variable, amb una incidència que varia molt segons la distribució geogràfica.

Estudiant l'estat mutacional de la cadena pesada de les Ig dels limfòcits s'ha demostrat que existeixen dos tipus de limfòcits que poden donar lloc a la B-CLL, els que no

presenten mutacions en aquests gens i els que en presenten, donat que han passat pel centre germinal i han entrat en contacte amb l'antigen.(Damle et al., 1999) Els limfòcits B verges i els que presenten memòria antigènica són indistingibles morfològicament però existeixen diferències a nivell pronòstic entre els casos amb i sense mutacions donat que els casos que presenten mutacions son casos que provenen de cèl·lules que han passat pel centre germinal i per tant presenten un millor pronòstic, mentre que aquells que no en tenen provenen del limfòcit B verge sent molt més agressius, amb més alteracions genètiques i amb pitjor pronòstic.(Hamblin et al., 1999;Stilgenbauer et al., 2002;Lin et al., 2002) Darrerament s'ha observat que l'expressió de la proteïna ZAP-70 correlaciona perfectament amb l'estat de les Ig, estant valors baixos d'expressió associats a hipermutació i valors alts a l'absència d'aquestes.(Crespo et al., 2003)

A nivell genètic la B-CLL és una neoplàsia amb relativament poques alteracions cromosòmiques sent els guanys del cromosoma 12 i les pèrdues de 17p, 11q, 13q i 14 i les mutacions de *TP53* les alteracions més freqüents.(Bea et al., 2002)

El mecanismes que porten a la progressió d'aquesta malaltia, és a dir a un canvi d'estadi, són poc coneguts, en un estudi recent en 16 casos de B-CLL amb mostra obtinguda al diagnòstic i després de la progressió, s'observa com tres pacients adquireixen mutacions de *TP53*, guanys de 5q21-q23 i 11pter-p14, i un guany del cromosoma 12 respectivament, durant la progressió de la malaltia. Per altra banda l'anàlisi del perfil d'expressió va mostrar canvis d'expressió significatius entre les mostres seqüencials (**Annex 1**).(Fernandez et al., 2008)

Tot i aquesta manca d'alteracions, les cèl·lules acumulen alteracions addicionals a través del temps i entre un 5 i un 10% dels casos de B-CLL transformació histològica a un limfoma de cèl·lules grans, fet que rep el nom de síndrome de Richter (RS). Aquests casos presenten relativament les mateixes alteracions que els casos no transformats, però amb més nombre de guanys i pèrdues i amb alteracions específiques com pèrdues de 8p i 9.(Bea et al., 2002)

Leucèmia prolimfocítica de cèl·lula B (B-PLL)

La B-PLL és una malaltia dels prolimfòcits B que afecta a sang, moll d'os i melsa i en la que els prolimfòcits superen el 55% de les cèl·lules de la sang. S'exclouen tots aquells casos de B-CLL transformada o B-CLL amb un elevat nombre de prolimfòcits.

Les cèl·lules expressen antígens de cèl·lula B sent CD5 present en un terç dels casos i CD23 absent. És una malaltia extremadament rara que afecta a pacients amb edat superior a 60 anys. Presenten de forma freqüent reordenament de Igs. L'alteració t(11;14)(q13;q32) es troba en un 20% dels casos i és per això que es confon de forma freqüent amb variants blastoides de MCL.

Limfoma limfoplasmàtic (LLP)

És una neoplàsia limfoide de baix grau que té origen a partir de limfòcits perifèrics. Està caracteritzada per una proliferació de tipus difús dels limfòcits B petits (CD5- i CD10-) amb tendència a diferenciar-se a cèl·lules plasmàtiques. Aquestes cèl·lules expressen poques Ig de superfície, però gran quantitat d'Ig citoplasmàtiques. És una malaltia rara que es dona en adults preferentment homes, i que normalment té un curs clínic bastant indolent tot i que pot evolucionar cap a un limfoma de cèl·lules grans més agressiu.

Limfoma esplènic (SMZL) i ganglionar (NMZL) de la zona marginal

El SMZL i el NMZL són dos entitats clinicopatològiques que han estat definides recentment.(Jaffe et al., 2001)Tots dos són limfomes de baix grau que s'originen en llocs d'inflamació crònica causada per infeccions i processos d'autoimmunitat.

SMZL és una malaltia poc freqüent (1-2% dels NHL) que implica la substitució, per part de limfòcits de mida petita, dels centres germinals de la melsa. Presenta afectació en melsa, moll d'os i sang perifèrica. Les cèl·lules tumorals presenten un patró immunohistoquímic CD20+, CD79-, CD5-, CD10-, CD23-, CD43-. Aquesta negativitat per CD5 i CD43 és molt útil per excloure els diagnòstics de B-CLL . A nivell genètic l'alteració cromosòmica més freqüent en aquesta malaltia és la pèrdua de 7q (7q22-q36) en aproximadament un 45% dels casos i el seu curs clínic és indolent amb una mitjana de supervivència d'entre vuit i 10 anys.(Mollejo et al., 2005)

NMZL és una neoplàsia de tipus B poc freqüent (1.8% de les neoplàsies limfoides) que s'origina en el gangli limfàtic amb un patró histològic semblant al SMZL, però només presenta evidència extra ganglionar en un terç dels casos.(Campo et al., 1999a) No existeixen alteracions genètiques exclusives d'aquest tipus de limfoma, però no presenten les alteracions associades a Limfoma MALT, t(11;18)(q21;q21) i trisomies del cromosoma 3.

Tricoleucèmia (HCL)

La HCL és una neoplàsia de cèl·lula B petita. Es caracteritza per cèl·lules amb nucli ovalat amb molt citoplasma el qual que presenta projeccions. A nivell immunohistoquímic presenta expressió de CD103, CD22 i CD11c i és negativa per CD5, CD10 i CD23. És una malaltia rara i compren només el 2% de les leucèmies limfoides. Els pacients són normalment adults, d'edat mitjana, amb predominància masculina.

Mieloma de cèl·lula plasmàtica o mieloma múltiple (MM)

El MM és una neoplàsia del moll de l'os, caracteritzada la presència de cèl·lules rodones de tipus plasmàtic en diferents grau de maduresa incloent formes atípiques. També es caracteritza per una destrucció de l'esquelet que té coma resultat dolor d'ossos, fractures patològiques i anèmia. Als Estats Units és la neoplàsia limfoide més freqüent en població negra i la més freqüent en població blanca. La mitjana d'edat al diagnòstic és 68 anys en homes i 70 anys en dones amb un relació home/dona de 1.1. A nivell genètic presenta en un 20% dels casos la translocació t(4;14)(p16;q32) i freqüents pèrdues de 13 i 19. És una malaltia incurable amb una supervivència mitjana de tres anys.

Limfoma Mucosa-associated Lymphoid Tissue (MALT)

El limfoma MALT és un limfoma morfològicament heterogeni de cèl·lula B petita, limfòcits petits, immunoblasts i cèl·lules centroblasts-like²⁸ CD20+, CD79+, CD5-, CD10 i CD23-. L' infiltrat es troba a la zona marginal dels fol·licles reactius i s'exten per tota la regió interfol·licular. Els Limfoma MALT són aproximadament un 7-8% de tots els limfomes de cèl·lula B. Es dona en pacients adults i sembla que existeix una major freqüència de Limfoma MALT gàstrics al nord- est d'Itàlia i a Sud Àfrica. El tracte intestinal és el lloc més comú d'aparició d'un Limfoma MALT (50%) sent l'estómac el lloc més comú (85% dels casos). El Limfoma MALT presenta un curs indolent i es dissemina de forma lenta tot i que les recaigudes poden involucrar llocs extra-ganglionars. Les alteracions genètiques més freqüents són la translocació t(11;18)(q21;q21) que es presenta entre un 25-50% dels casos i la trisomia 3 que es troba en un 60%.

Limfoma fol·licular (FL)

El FL és un limfoma de baix grau derivat de cèl·lules B immadures del centre germinal que han adquirit en la majoria dels casos la translocació t(14;18)(q32;q21) que desregula el gen *BCL-2* sent una de les formes més comuns de NHL (aproximadament el presenten un 22% dels pacients). Presenta una proliferació mixta de dos tipus cel·lulars, els centròcits²⁹ i els centroblasts³⁰. El tumor pot estar únicament format per centròcits o bé per tots dos tipus cel·lulars alhora. Els FL histològicament són molt característics, tenen estructures fol·liculars de mida uniforme i esfèrica distribuïdes per tot el gangli limfàtic. Fenotípicament expressen Ig de superfície i antígens de línia B com CD19, CD20 i CD22. També expressen CD10 i BCL-6.).

El curs clínic és variable, alguns pacients presenten un curs indolent i la malaltia progressa de forma lenta, mentre que en altres, la malaltia progressa ràpidament. Els mecanismes moleculars i cel·lulars que provoquen aquesta heterogeneïtat són desconeguts, malgrat tot, alguns treballs han descrit alteracions secundàries que podrien donar llum a aquesta variabilitat.(Bentz et al., 1996;Avet-Loiseau et al., 1997;Viardot et al., 2002;Zhang et al., 2004) En alguns casos el tumor pot patir una transformació agressiva a DLBCL, en la qual les cèl·lules limfoides grans (centroblasts) comencen a predominar sobre les cèl·lules més petites (centròcits); aquest progressió d'un patró nodular a un de difús està associada a un pitjor pronòstic dels pacients. Alguns tumors presenten alteracions secundàries a banda de la translocació t(14;18)(q32;q21) que poden tenir un paper en la transformació a DLBCL. Estudis recents d'arrays d'expressió han demostrat que el patró d'expressió defineix dues signatures de resposta immune que poden predir el pronòstic dels pacients (Dave et al., 2004)

Limfoma difús de cèl·lules grans (DLBCL)

Els DLBCLs són un grup heterogeni de limfomes que deriven de cèl·lules B grans activades per antígens, presentant un elevat índex proliferatiu i un creixement ràpid i destructiu i sent les cèl·lules majoritàries centroblasts i els immunoblasts³¹. El patró immunofenotípic és CD5 i CD10 negatiu i CD19, CD20, CD22, i CD79 positiu, malgrat que existeix certa variabilitat i s'han descrit sub-grups que presenten un patró CD5 negatiu.(Harada et al., 1999) El DLBCL és un dels limfomes més freqüents en adults a nivell mundial, amb una freqüència que oscil·la entre un 30 i un 40% dels NHL. La seva diversitat a nivell de presentació clínica i de supervivència i l'heterogeneïtat a nivell patològic i molecular suggereix que els DLBCLs inclouen certa diversitat que

també es reflexa a nivell terapèutic. Estudis recents han identificat 2 grans subgrups basats en el perfil d'expressió gènica anomenats DLBCL del centre germinal (GCB-DLBCL) i DLBCL de cèl·lula B activada (ABC-DLBCL). (Alizadeh et al., 2000; Rosenwald et al., 2002) Els GCB-DLBCL es caracteritzen per amplifícacions freqüents del gen *REL*, translocacions que impliquen el gen *BCL2*, de la mateixa manera que es dona en els FL, suggerint una possible evolució d'aquest tipus de tumors a partir de FL, i hipermutacions somàtiques dels gens de les Ig. (Rosenwald et al., 2002; Rosenwald et al., 2003a; Savage et al., 2003) En canvi els ABC-DLBCL presenten un patró d'activació constitutiva factor nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$). Clínicament presenta un curs agressiu però amb possibilitat de curació. Algunes alteracions genètiques s'han associat a un pitjor pronòstic dels pacients com els guanys de 18q (**Annex 2**), (Bea et al., 2004) i de les regions del cromosoma 3 (3p11-p12, 3q11-q13, i 3q24-q25) (**Annex 3**). (Bea et al., 2005)

Per altra banda, s'ha descrit darrerament que la baixa expressió MHC de classe II (MHCII) està associada a un pitjor pronòstic en DLBCL, (Rimsza et al., 2004) estant descrita una associació d'aquesta desregulació amb delecions cromosòmiques dels loci que formen el MHCII en un subtipus de DLBCL localitzats en lloc immuno-privilegiats com són els testicle o el sistema nerviós central (IP-DLBCL). (Jordanova et al., 2002) Tot i així estudis recents correlacionant dades de CGH amb estudis d'expressió han demostrat que aquesta correlació no es manté en casos que de DLBCL amb diferent localització, sent les delecions d'aquests poc freqüents i sent mecanismes d'alteració de la transcripció els responsables d'aquesta infra-expressió (**Annex 4**). (Rimsza et al., 2006)

Limfoma B primari mediastínic (PMBCL)

El PMBCL és un tumor molt semblant al DLBCL a nivell histològic. Malgrat tot, es presenta típicament en dones joves i es localitza als ganglis limfàtics mediastínics, a diferència dels DLBCL. Les cèl·lules que caracteritzen aquest tumor presenten un citoplasma pàl·lid i un patró de creixement difús. (Savage et al., 2003)

Aquests tumors presenten també unes alteracions genètiques característiques, com guanys de 9p i 2p, associats respectivament als gens *JAK2* (9p24) i *REL* (2p16) (Bentz et al., 2001; Joos et al., 1996) De la mateixa manera que els ABC-DLBCL presenten un patró d'activació constitutiva factor nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) igual que ABC-DLBCL però

en contrast amb els DLBCL, els PMCBCL no presenten reordenaments de *BCL-2*. (Bea et al., 2005)(Annex 3)

Limfoma de cèl·lules del mantell (MCL)

El MCL és una neoplàsia limfoide ben definida que es caracteritza per la t(11;14)(q13;q32), que té com a resultat la sobre-expressió constitutiva de CCND1. Aquest limfoma està compost per una proliferació monomòrfica dels limfòcits de mida petita-mitjana amb nucli irregular i amb un fenotip B madur que expressa generalment CD5 i no expressa CD23. La freqüència del MCL es troba entre un 3 i un 10% dels NHL i predomina en pacients masculins d'edat avançada (Edat mitjana 60 anys). La majoria dels pacients presenten malaltia en estadi IV³², limfadenopatia generalitzada, hepatoesplenomegalia³³ i afectació de moll d'os. El comportament clínic és molt agressiu i pocs pacients presenten una supervivència llarga (entre 3 i 4 anys) amb un tractament convencional i molt pocs es poden arribar a considerar curats. (Campo et al., 1999b; Swerdlow & Williams, 2002)

Existeix una variant més agressiva d'aquesta neoplàsia anomenada MCL blastoide que pot sorgir *de novo* o ser una forma progressada de formes de MCL típiques i que es manifesta aproximadament en un 10-20 % dels casos de MCL. Segons la classificació de la WHO (Jaffe et al., 2001) aquesta forma agressiva es subdivideix en dues variants anomenades blàstica i pleomòrfica. Totes dues variants estan associades a un índex de proliferació elevat, cariotips complexes, tetraploidització (36% dels blàstics i 80% dels pleomòrfics *versus* 8% de les variants típiques, $P < 0.001$), (Ott et al., 1997) i a un pitjor pronòstic. (Campo et al., 1999b) Per una banda els MCL blàstics presenten una població monòtona de limfòcits de mida mitjana, nucli arrodonit, i cromatina dispersa. Per altra banda els MCL pleomòrfics es caracteritzen per una població cel·lular més heterogènia de cèl·lules grans amb nuclis irregulars i nucleol quasi indistingible.

Malgrat l'agressivitat descrita en aquesta malaltia, observacions clíniques recents han identificat alguns pacients amb una forma més indolent de malaltia, que presenta una supervivència llarga, fins i tot sense necessitat de tractament, suggerint que el comportament biològic d'aquest tumor pot ser més heterogeni del que es pensava inicialment. (Nodit et al., 2003; Orchard et al., 2003; Espinet et al., 2005)

Leucemització en MCL

Durant anys s'ha descrit el fenomen d'expressió leucèmica en MCL com un fenomen ocasional i no sempre present. La seva incidència varia bastant en els diferents estudis trobant-se entre un 13 i un 77% dels casos.(Argatoff et al., 1997; Bosch et al., 1998; Duggan et al., 1990; Cohen et al., 1998; Samaha et al., 1998) Tot apunta a que les discrepàncies poden ser degudes a una selecció dels pacients tenint en compte un criteri morfològics i immunofenotípics diferents. A més a més, en moltes d'aquestes series no s'ha realitzat una revisió histològica o una extensa caracterització immunofenotípica. Per altra banda s'han realitzat alguns estudis que comparen les alteracions genètiques entre els pacients que presenten MCL de tipus ganglionar i MCL leucèmic en els quals s'associen algunes alteracions a la disseminació leucèmica. Particularment l'anàlisi de les alteracions genètiques en casos leucèmics mostra que les pèrdues de la regió cromosòmica 8p21.3 on està localitzat el *cluster*³⁴ de gens receptors *TRAIL*, anomenats *DR4* i *DR5*, són més freqüents en aquests pacients que no pas en els pacients que presenten malaltia de tipus ganglionar.(Martinez-Climent et al., 2001)

Malgrat tot, en un estudi mutacional per aquests dos receptors es conclou que les mutacions de *DR4* i *DR5* són poc freqüents en MCL leucemitzats i en cap cas estan associades a una pèrdua de l'altre al·lel.(Fernandez et al., 2004) (**Annex 5**)

CCND1 com a oncogen

Com ja s'ha explicat en l'apartat de *cicle cel·lular* d'aquesta tesi, *CCND1* és un membre de les ciclines D que regula la transició de fase G0/G1 a fase S del cicle cel·lular. *CCND1* no s'expressa normalment en cèl·lules limfoides sinó que és el fenomen de juxtaposició amb el promotor de les Ig el que provoca la seva sobre-expressió en tots els casos de MCL. El gen de la *CCND1* conté cinc exons que creen, mitjançant *splicing* alternatiu dues isoformes majoritàries: *CCND1a* i *CCND1b* (**Figura 12A**).

CCND1a està codificada bàsicament per dos transcrits, llarg i curt de 4.5 i 1.5 kb de longitud respectivament, que es diferencien en la longitud de la regió 3' no traduïda, però que contenen tots dos tota la regió codificant que genera el polipèptid de 36 kDa. S'ha descrit que al voltant d'un 4-10% dels MCL amb alts nivells de proliferació, no presenten el transcrit llarg, i en el seu lloc, expressen un mRNA aberrant amb la regió 3' no traduïda més curta. Aquest mRNA presenta pèrdua de les regions desestabilitzadores AUUUA de la *CCND1* no associada a un *splicing* alternatiu sinó a un truncament en la regió 3'UTR que pot ser causat per delecions genòmiques, mutacions puntuals en el 3' que generen llocs prematurs de poliadenilització i que donen lloc a transcrits d'una mida de més reduïda (Wiestner et al., 2007) o bé per reorganitzacions cromosòmiques

addicionals.(Seto et al., 1992;de Boer et al., 1997;Komatsu et al., 1994;Rimokh et al., 1994) L'abundància del mRNA de *CCND1* és molt més elevada en aquest tumors que no pas en aquells en els quals la *CCND1* presenta la regió 3' UTR. A més, en assaigs amb línies cel·lulars s'ha demostrat que aquest transcrits curts presenten una vida mitja molt més llarga. Per tant, sembla ser que aquest tipus d'alteracions augmenten significativament l'efecte oncogènic i el curs clínic d'aquests pacients(**Figura 12B**).(Rimokh et al., 1994)

L'isoforma *CCND1b* de 1.7kb de longitud, en canvi, no conté l'exó 5 però reté l'exó 4 que conté un codó *stop*³⁵ al cap de 99 parells de bases i un senyal de poliadenilització a menys de 300 parells de bases d'aquest codó *stop*. La pèrdua d'aquest últim exó implica la pèrdua de les seqüències PEST³⁶ que marquen les proteïnes per a ser destruïdes de forma ràpida. La *CCND1b*, es troba en la majoria de tumors i de línies cel·lulars que expressen CCND1. A diferència de la CCND1a, la CCND1b té un gran poder transformador en models experimentals, malgrat que el mecanisme oncogènic no està ben estudiat.(Solomon et al., 2003)

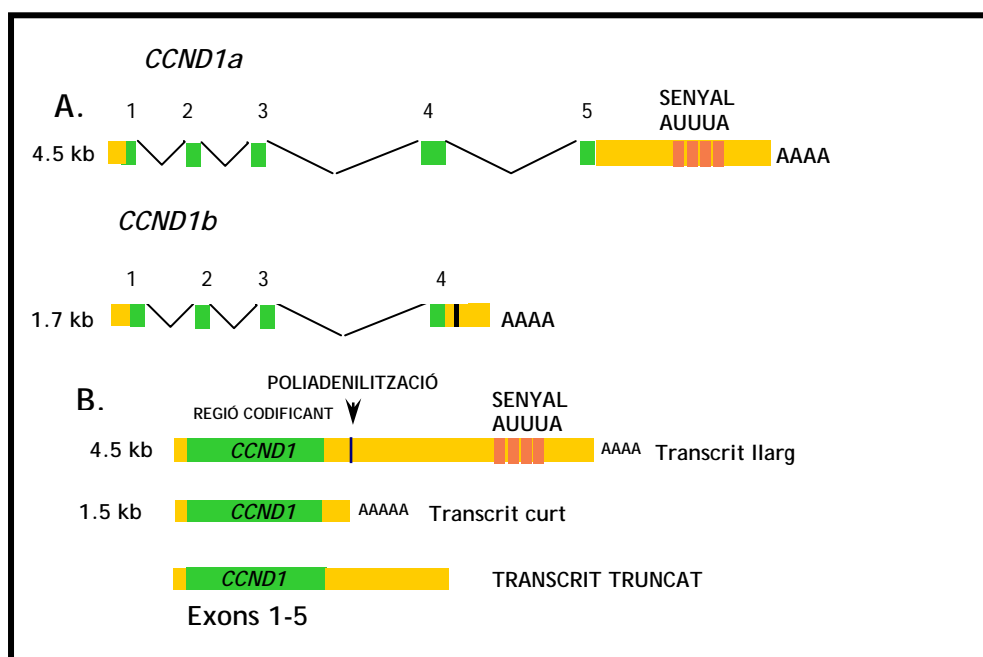


Figura 12. Diferents isoformes de la CCND1 (A) i diferents transcrits de la *CCND1a* observats en MCL (B)

MCL CCND1 -negatius

Darrerament, alguns estudis senyalen l'existència de casos amb un patró morfològic i fenotípic idèntic a la resta de MCL però amb la diferència que la translocació t(11;14)(q13;q32) no és detectable, o bé els nivells de CCND1 no mostren una sobre-

expressió d'aquest gen. Durant anys, l'existència d'aquests casos ha estat controvertida tenint en compte que els mètodes de detecció de la translocació i dels nivells d'expressió presenten una sensibilitat variable. Darrerament, els estudis mitjançant arrays d'expressió en tumors, han permès estudiar la genòmica del tumor mitjançant l'estudi dels valors d'expressió dels gens de forma quantitativa, han permès crear perfils específics per a cada tipus de malaltia i concretament han fet possible comprovar l'existència d'aquest subgrup de casos de MCL que no expressen CCND1 malgrat presenten una perfil d'expressió idèntic a la resta de mantells i una supervivència similar, suggerint que pertanyen a la mateixa entitat. (Rosenwald et al., 2003b; Fu et al., 2005) S'ha vist també que alguns d'aquests casos presenten expressió de CCND2 o CCND3, suggerint que aquestes ciclins puguin fer una funció substitutòria de la CCND1, donat que sembla indispensable que algun fenomen acceleri el pas de fase G1 a S en aquesta neoplàsia.

Proliferació i supervivència en MCL

Un dels marcadors pronòstics més importants en els MCL és la proliferació, la qual ha estat valorada durant anys mitjançant l'índex mitòtic³⁷ o contant el nombre de cèl·lules que expressaven l'antigen associat a proliferació Ki67. (Swerdlow & Williams, 1993; Bosch et al., 1998; Tiemann et al., 2005) Per tal d'estudiar les bases moleculars que hi ha darrera d'aquesta elevada proliferació, estudis recents han valorat la proliferació d'una sèrie de 101 pacients a partir de la valoració de l'expressió d'un conjunt de 20 gens que s'expressen a nivells més alts en les cèl·lules en divisió que en les quiescents i que inclou gens implicats en la replicació del DNA, en la progressió del cicle cel·lular i en els requisits metabòlics de la proliferació. Per a crear aquest mètode diagnòstic, basat en dades d'expressió, s'ha realitzat un test estadístic Bayesià que permet diferenciar els MCL d'altres tipus de limfomes i també distingir entre els pacients amb una supervivència mitjana diferent. (Rosenwald et al., 2003b)

Models per a estudis pre-clínic: Línies cel·lulars en limfoma de cèl·lules del mantell i models animals

Els models experimentals en MCL igual que en altres malalties són eines importants per investigar els mecanismes involucrats en la patogènesi d'aquests tumors. En l'actualitat han esdevingut essencials per a poder testar noves drogues que interactuen amb diferents mecanismes del cicle cel·lular que provoquen el desenvolupament i la

progressió dels tumors. Els models actuals utilitzats són les línies cel·lulars i models animals que presumiblement estan molt relacionats amb el tumor humà. tenen les seves limitacions ens proporcionen una eina que pot ser molt valuosa en estudis clínics per tal de seleccionar diverses drogues i estratègies que puguin millorar el pronòstic dels pacients.

Les línies cel·lulars limfoides són un bon model *in vitro* que facilita l'anàlisi dels cariotips complexos i dels patrons d'inestabilitat genòmica, de manera que són una gran font d'informació per a entendre els mecanismes implicats en la patogènesi. A més, també són una font il·limitada d'una població relativament uniforme.

Tenint en compte l'heterogeneïtat dels tumors humans i particularment dels MCL, és important tenir un nombre elevat de línies cel·lulars que mimetitzin amb la variabilitat de les diferents situacions clíniques. En els últims anys s'han establert 13 línies cel·lulars derivades de MCL, tot i que algunes d'aquestes línies van ser establertes abans que aquesta entitat estigués ben definida (**Taula 2, Annex 6**). (Salaverria et al., 2006) La caracterització d'aquestes línies és irregular, però proporciona un bon espectre de les característiques moleculars i genètiques dels MCL. Un altre fenomen a comentar en estudis pre-clínics amb línies cel·lulars és el risc de contaminació creuada amb altres línies cel·lulars. Un bon exemple és l'alta proporció de contaminació observada (14%) en l'estudi de 630 línies d'origen limfoide. (Drexler & MacLeod, 2006)

Taula 2. Línies cel·lulars de MCL que presenten la translocació t(11;14) (q13;q32) (Salaverria et al., 2006)

	HBL-2	JVM-2	SP-49/-50B/-53	REC-1	NCEB-1	GRANTA-519	MINO	Z-138	JEKO-1	M-1	UPN-1	UPN-2	MAVER-1
Edat/Sexe	84/H	63/D	58/D	61/H	57/M	58/D	64/D	70/H	78/D	58/H	52/H	57/H	77/H
Diagnòstic original	DLBCL	PLL	ILL	MCL	Dcb/ccL	MCL	MCL	Blastoid MCL	MCL	Blastoid MCL	Blastoid MCL	MCL	MCL
Mostra	GL	SP	SP	GL	SP	SP	SP	MO	SP	SP	Efusió pleural	Efusió pleural	SP
Sobre-expressió Cyclin D1	++	+	+	++	+	+	+	++	+		++	++	+
CD5	-	+	-		+	-	+	-	+	+	+	+	+
CD23	+	+	+		+	+	-	-	-	-	-	+	-
EBV	-	+	-/+/-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
Ploidia	2N	2N	3N	2N-	4N-	2N-	3N+	2N+	3N-	2N+	2N-	3N+	2N
p53	del/*	wt/wt		wt/wt	del/mut	del/wt	#/mut	wt/*	del/mut		#/mut	del/mut	del/mut

<i>ATM</i>	wt/wt	wt/*	del/* [¶]	del/mut [¶]		ampl/*	#/polimorf	#/mut	del/*
<i>p16INK4A</i>	del/*	wt/#	Hom del	wt	Hom del	del/*	del/*		del/*
Altres oncogens				BCL-2 amp			MYC R BCL-2 amp	MYC R	MYC R

H home; D dona; DLBCL: Diffuse large cell lymphoma; DCbCCL: Diffuse centroblastic centrocytic lymphoma;ILL: Intermediate lymphocytic lymphoma; PLL: Prolymphocytic leukaemia; GL: Gangli limfàtic; SP: Sang perifèrica;MO: moll d'os; EBV: Epstein-Barr virus; CC: Citogenètica convencional; Del: Del heterozigota; mut: mutat;homo del: deleció homozigota; wt: wild type; [¶]ATM expressió proteica negativa; WB: Western Blot; +, expressió positiva,++ expressió alta; -, expressió negativa/no detectable; * estudi mutacional no realitzat;

Delecions no analitzades.

Limfoma B intravascular (IVL)

L'IVL és una malaltia agressiva i disseminada que es caracteritza per la presència de cèl·lules tumorals només a la llum dels vasos petits, normalment capil·lars. Afecta de forma predominant a gent d'edat avançada però degut al nombre reduït de casos no existeixen característiques epidemiològiques específiques. El cervell i la pell són els llocs de manifestació de la malaltia més comuns. Els casos d'IVL presenten freqüentment afectació de fetge, melsa i moll d'os, mentre que l'afectació ganglionar és rara en aquesta malaltia. La supervivència és generalment baixa, però l'ús de teràpies intensives en estadis primerencs pot augmentar la supervivència en pacients joves.(Ferreri et al., 2004)

Limfoma d'efusió primària (PEL)

El PEL és una neoplàsia de cèl·lules B que es presenta en efusions seroses sense detectar-se masses tumorals. Està associada de forma universal al virus Herpes humà 8 (HHV 8). La majoria dels casos es troben el marc d'una immunodeficiència per HIV. La majoria dels pacients són homes joves o d'edat mitjana homosexuals. Els llocs més comuns d'afectació són la pleura i les cavitats pericardial i peritoneal. El pronòstic és extremadament desfavorable amb i sense teràpia.

Limfoma de Burkitt (BL)

El BL es caracteritza per una expansió clonal de les cèl·lules B d'origen desconegut, probablement cèl·lules B de la reacció primerenca del centre germinal. Morfològicament es caracteritza per un patró de cel estrellat, donada la presència d'un nombre elevat d'histiòcits que fagociten les restes cel·lulars producte de l'apoptosi.

Existeixen tres variants amb diferents manifestacions clíniques, morfològiques i biològiques: BL endèmic, BL esporàdic, i BL associat a immunodeficiència. A nivell morfològic també s'han definit dues variants anomenades BL clàssic i BL atípic o *BL-like*³⁸. Aquesta segona variant a diferència dels Classic BL presenta un nucli amb gran pleomorfisme tant a nivell de mida com de forma. Les cèl·lules presenten generalment expressió de CD10 i també poden expressar Ig de superfície. Clínicament, és un limfoma agressiu tot i que en nens hi ha una bona resposta davant una teràpia intensiva. Un estudi recent de l'expressió en 303 pacients amb limfoma B agressiu defineix quatre *clusters* d'expressió prominent que reben el nom de signatures d'expressió associades específicament a BL i utilitzant aquest patró d'expressió específic, defineix una sèrie de vuit casos de DLBCL que presenten un perfil d'expressió de BL els quals anomena BL discrepants.(Dave et al., 2006) Per altra banda, els estudis genètics mitjançant CGH i CGH array han descrit alteracions secundàries en BL.(Macpherson et al., 1999;Wessendorf et al., 2003;Garcia et al., 2003;Lones et al., 2004;Barth et al., 2004;Pienkowska-Grela et al., 2005;Onciu et al., 2006) L'estudi amb més nombre de casos per CGH descriu guanys de 12q, 22q, Xq i pèrdues de 13q com les alteracions més freqüents en BL. A més, les alteracions d'1q i 7q estan associades a un pitjor pronòstic.(Garcia et al., 2003) Per altra banda un estudi del nostre grup, actualment en revisió, defineix el perfil de CGH i d'expressió de 51 pacients de BL, mostrant que els BL clàssics i els BL atípics, tant en pacients adults com en pediàtrics, presenten un perfil d'alteracions comú mentre que els BL discrepants es diferencien de forma dramàtica a nivell de complexitat cariotípica i nombre d'alteracions tant dels BL clàssics i atípics com de DLBCL (**Annex 7**).(Salaverria et al. en revisió)

Els limfomes de cèl·lula T

Els limfomes de cèl·lula T expressen marcadors específics de línia T (CD3, CD5, CD2 i CD7), i també es caracteritzen per reordenaments dels gens codificats per les cadenes del TCR.

Limfoma de cèl·lula T precursora

Leucèmia limfoblàstica de precursor T (T-ALL/Limfoma limfoblàstic (T-LBL)

T-ALL és una neoplàsia de limfoblasts típicament composta de blasts de tipus T de mida petita-mitjana amb afectació a moll d'os i sang. Afecta de forma comú a adolescents i és més freqüent en homes que en dones. En una tercera part dels T-ALL

s'han detectat translocacions que impliquen el receptor de cèl·lula T δ i β , i diferents gens com *MYC*, *T11*, *RBTN1* *RBTN2* i *HOX-1*, implicant la desregulació d'aquests últims. La pèrdua de 9p, que inclou el gen *P16*, té lloc en un 30% dels casos. És una malaltia freqüentment curable utilitzant teràpies agressives, però molt desfavorable en pacients pediàtrics.

Limfoma de cèl·lules perifèriques o Natural Killer

Constitueixen aproximadament un 10-15% de tots els NHL en països occidentals, tot i que són més freqüents a l'extrem Oriental. Inclouen un grup molt ampli de neoplàsies amb morfologia i presentacions clíniques diverses. Generalment els limfomes T perifèrics ganglionars deriven de limfòcits CD4 positius a diferència de cèl·lules NK. Clínicament el curs d'aquests limfomes és agressiu i presenten freqüentment recurrències.

Leucèmia prolimfocítica de cèl·lula T (T-PLL)

La T-PLL és una leucèmia de cèl·lula T molt agressiva que es caracteritza per la proliferació de prolimfòcits³⁹ de mida petita-mitjana amb afectació de sang, moll d'os, ganglis limfàtics, melsa i pell. La freqüència de la T-PLL és relativament baixa i no sobrepassa el 2% dels casos de leucèmia limfocítica de cèl·lula petita en adults majors de 30 anys. Les alteracions citogenètiques d'aquest tipus tumoral són inversions del cromosoma 14, amb punts de trencament a 14q11 i 14q32, que es troben en el 80% dels casos. Un 10% dels casos presenten la translocació t(14;14)(q11;q32), que juxtaposa el TCR i amb els gens *TCL1a*, *TCL1b* activant-los i també és freqüent la translocació t(X;14)(q28;q11); aquestes translocacions les quals juxtaposen el TCR amb els gens *TCL1* i *MTCP-1* respectivament, els quals actuen com co-activadors de AKT. També existeixen alteracions del cromosoma 8 amb formació de cromosomes dicèntrics i trisomies 8q (70-80% dels casos).

Leucèmia limfocítica de cèl·lules grans granulars tipus T (T-LGL)

T-LGL és una neoplàsia molt heterogènia que es caracteritza per un augment persistent del nombre de limfòcits granulars de sang perifèrica, normalment sense una causa específica. Es diferencia en dos variants en funció dels marcadors antigènics (variant comú i variant rara). La majoria dels casos presenten un curs indolent. No existeix una alteració citogenètica característica d'aquesta entitat, però les translocacions rarament han estat descrites en aquesta malaltia.

Leucèmia/ limfoma de cèl·lula T d'adults (ATLL)

ATLL és una neoplàsia de cèl·lula T perifèrica que es compon de molts cops de gran quantitat de cèl·lules limfoides pleomòrfiques. Està causada pel retrovirus humà R-Cell leukaemia virus type I (HTLV-1). ATLL és endèmica en diferents regions del món entre les quals es troben el Japó, el Carib i l'Àfrica central. Aquesta distribució està clarament associada a la prevalència d'HTLV-1 a la població, i en són afectats preferentment homes i dones d'edat mitjana. La supervivència d'aquests pacients és variable, pot anar de dos mesos a més d'un any. Les alteracions més freqüentment observades en aquesta neoplàsia són guanys de 14q, 7q i 3p i pèrdues de 6q i 13q. (Tsukasaki et al., 2001)

Micosis fungoides/Síndrome de Sézary

La **Micosis fungoides** és el subtipus de limfoma de cèl·lula T que es presenten amb plaques a la pell i es caracteritzen per infiltració dèrmica i epidèrmica.

La **Síndrome de Sézary** es un limfoma de cèl·lula T molt generalitzat que es caracteritza per la presència de eritroderma, limfoadenopatia i limfòcits T en sang. Les lesions de la síndrome de Sézary són similars a les de les micosis fungoides.

Limfoma perifèric de cèl·lules T, no especificat (PTCL-U)

Un gran nombre de diferents entitats han estat definides com a subtipus de limfomes de cèl·lula T. Malgrat tot, un gran grup de casos de limfoma de cèl·lula T, preferentment ganglionars, que constitueixen una proporció significativa dels limfomes T dels països occidentals es caracteritzen per no poder ser classificats dins de cap grup definit. Per a referir-se a aquest conjunt de casos s'ha creat el concepte de Limfoma T perifèric no especificat (PTCL-U). La majoria d'aquests casos es donen en pacients adults, però també existeixen alguns casos pediàtrics. Recentment, s'han descrit alteracions genètiques associades a aquesta entitat com guanys de 7q, 17q, 16p i 9q i pèrdues de 13q, 6q i 9p. (Zettl et al., 2004)

Limfoma anaplàsic de cèl·lules grans (ALCL)

ALCL és una neoplàsia de cèl·lula T que es caracteritza per translocacions recurrents que impliquen el gen anaplastic lymphoma quinasa (*ALK*) situat a 2p23, que donen lloc a l'expressió de la proteïna ALK. El gen *ALK* és un gen que s'expressa de forma constitutiva a l'intestí, als testicles i al cervell, però no en limfòcits normals, alhora que presenta una gran similitud de seqüència a la subfamília de quinases receptores de la insulina. Aquests tumors constitueixen una entitat de limfoma T molt ben definida que

es manifesta en homes joves i que té en general un bon pronòstic, tot i que alguns pacients moren per la progressió de la malaltia. Morfològicament, els tumors presenten un espectre morfològic que va de cèl·lules grans atípiques a una variant de cèl·lula petita que expressa de forma constant el receptor de citoquina CD30.(Benharroch et al., 1998;Shiota et al., 1995;Falini et al., 1999)

La translocació més comú que implica el gen *ALK* és la translocació t(2;5)(p23;q35), que fusiona el gen *ALK* amb el gen de la Nucleofosmina (*NPM*). S'han escrit translocacions alternatives en un 20% dels casos; aquestes altres translocacions impliquen diversos gens com *TPM3*,(Lamant et al., 1999) *TFG*,(Hernandez et al., 1999) *ATIC*,(Wlodarska et al., 1998;Ma et al., 2000;Trinei et al., 2000;Colleoni et al., 2000) *TSPYL2*,(Touriol et al., 2000)*MSN*,(Tort et al., 2001;Tort et al., 2004) *KIAA1618*, (Cools et al., 2002) i *MYH9* (**Figura 14**).(Lamant et al., 2003) El conjunt d'aquests tumors que presenten aquestes translocacions reben el nom d'**ALCL ALK-positius**. Aquestes alteracions tenen potencial neoplàsic i sembla ser que en les cèl·lules transformades *in vitro* es veuen certes diferències a nivell de creixement cel·lular, migració i capacitat invasiva, que podrien influenciar també el comportament biològic dels tumors.(Armstrong et al., 2004) A banda dels ALCL ALK-positius, alguns estudis reconeixen un limfoma de cèl·lula gran tipus T que presenta un patró morfològic i fenotípic similar, però que a diferència del grup anterior no presenta cap alteració genètica que impliqui en gen *ALK*. A nivell clínic, són lleugerament diferents donat que es presenten en pacients més adults d'edat més avançada i amb un curs agressiu.(Falini et al., 1999;Gascoyne et al., 1999;Suzuki et al., 2000)

En un estudi en el qual s'estudien 123 casos de limfomes que expressen la proteïna *ALK* demostren l'evidència que els patrons morfològics dels ALCL descrits en estudis previs són diferents subtipus de la mateixa entitat, argumentant perquè les neoplàsies *ALK*-positives són una entitat diferent i conclouent que tot aquest grup hauria de ser classificat dins d'un grup anomenat limfomes *ALK*.(Benharroch et al., 1998) Malgrat les diferències, aquest grup de ALCL *ALK*-negatius va ser classificat en la tercera edició de la WHO *classification* juntament amb els ALCL *ALK*-positius. (Delsol et al., 2001)

Estudis recents d'expressió han avaluat 32 tumors primaris i 5 línies cel·lulars derivades de ALCL, demostrant que existeix un perfil d'expressió diferent entre ALCL *ALK*-positius i ALCL *ALK*-negatius, en el qual alguns gens són estadísticament discriminadors entre totes dues entitats (*BCL-6*, *PTPN12*, *CEBPB* i *SERPINA*).(Lamant

et al., 2007) Per altra banda s'han estudiat les alteracions secundàries de 74 ALCL mitjançant CGH, observant-se que els guanys de 17p i 17q24-qter i les pèrdues de 4q13-q21, i 11q14 esta associats als casos ALK-positius mentre que els guanys de 1q i 6p21 són més freqüents en els tumors ALK-negatius (**Annex 8**).(Salaverria et al., 2008) Recolzant-se en aquest dos estudis recents, a la darrera versió de la WHO, en preparació, es conclou que malgrat que no hi ha cap evidència per considerar diferents dos tumors que presenten les mateixes característiques morfològiques i fenotípiques, es poden considerar com a entitats diferents.

Translocació cromosòmica	ALK partner	Proteïna de fusió	Localització d'ALK
t(2;5)(p23;q35)	<i>NPM</i>	80 Kd	Nuclear+Citoplasmàtica
t(1;2)(q25;p23)	<i>TPM3</i>	104 Kd	Citoplasmàtica
t(2;3)(p23;q21)	<i>TFG</i>	85 Kd 97 Kd 113 Kd	Citoplasmàtica
Inv(2) (p23 q35)	<i>AT1C</i>	96 Kd	Citoplasmàtica
t(2;22)(p23;q11)	<i>TSPYL2</i>	248 Kd	Citoplasmàtica
t(2;X)(p23;q12)	<i>MSN</i>	125 Kd	Membrana
t(2;17)(p23;q25)	<i>KIAA1618</i>		Citoplasmàtica
t(2;22)(p23;q11.2)	<i>MYH9</i>	220 Kd	Citoplasmàtica

Domini kinasa

Figura 14. Resum de les diferents translocacions del gen *ALK* en ALCL

Alteracions cromosòmiques en Limfomes No-Hodgkin

La combinació de CC, M-FISH, FISH, i CGH ha proporcionat una eina molt útil per a la configuració d'un perfil global de les alteracions primàries i secundàries dels NHL, el qual ha suposat una gran ajuda en la seva classificació, donada l'estreta associació que s'estableix entre certes entitats tumorals i certes alteracions específiques. Per tant, de l'estudi citogenètic de les neoplàsies limfoides es pot concloure que els canvis cromosòmics no són a l'atzar, cada neoplàsia presenta unes alteracions cromosòmiques específiques que impliquen cromosomes, regions i bandes diferents.

Alteracions primàries (translocacions)

La majoria dels B-NHL, però només una minoria del T-NHL, estan caracteritzats per translocacions cromosòmiques recurrents; moltes d'elles inclouen el promotor de la cadena pesada de les Ig localitzat a 14q32, o les cadenes lleugeres de les Ig localitzades a 2p12 i 22q11.2. Aquest fenomen ve afavorit pel *class switching*⁴⁰ que es produeix en les cèl·lules B. Les translocacions són sobretot freqüents en cèl·lules del centre germinal i poden implicar diferents *partners* donant lloc a una expressió anòmala d'un proto-oncogen (**Taula 3**). En el cas de T-NHL és el TCR l'implicat en la translocació, la translocació de la cadena κ localitzada a 14q11-q12, tot i que la freqüència és menor, segurament degut a l'absència d'hipermutació somàtica i de *class switching*.

Taula 3. Taula de diferents translocacions observades en NHL

Neoplàsia limfoide	Alteració cromosòmica	Gen implicat	Funció Biològica	Mecanisme oncogènic
MCL	t(11;14)(q13;q32)	<i>CCND1</i>	Regulador del cicle cel·lular	Desregulació de l'expressió
FL/DLBCL	t(14;18)(q32;q21)	<i>BCL-2</i>	Inhibidor de l'apoptosi	Desregulació de l'expressió
DLBCL	t(3;v)(q27;v)	<i>BCL-6</i>	Repressor de la transcripció	Desregulació de l'expressió
BL	t(8;14)(q24;q32)	<i>MYC</i>	Factor de transcripció	Desregulació de l'expressió
	t(2;8)(p11;q24)			
	t(8;22)(q24;q11)			
MM	t(11;14)(q13;q32)	<i>CCND1</i>	Regulador del cicle cel·lular	Desregulació de l'expressió
	t(4;14)(p16;q32)	<i>FGFR3;WHSC1</i>	Receptor de factor de creixement de fibroblasts; proteïna de desenvolupament	Desregulació de l'expressió
ALCL	t(2;5)(p23;q35)	<i>ALK</i>	Receptor tirosin quinasa	Proteïna de fusió
	t(2;v)(p23;v)			
T-PLL	t(X;14)(q28;q11)	<i>MTCP-1</i>	Co-activador d'AKT	Desregulació de l'expressió
	inv(14;14)(q11q32)	<i>TCL1</i>	Co-activador d'AKT	Desregulació de l'expressió
t(14;14)(q11;q32)				

Com ja s'ha comentat a l'apartat de ***Limfoma de cèl·lules del Mantell*** d'aquesta tesi, un exemple d'aquest fenomen, és la translocació t(11;14)(q13;q32) que implica la sobreexpressió del gen *CCND1* localitzat a 11q13. Aquesta translocació es dona al moll d'os en els limfòcits B primerencs, a l'estadi de pre-diferenciació pre-B i es troba en el 90% dels MCL, però rarament en altres tipus de limfomes B. En darrers treballs citogenètic-moleculars s'han descrit translocacions t(11;14)(q13;q32) críptiques que impliquen els loci *IGH* i *CCND1* i d'altres cromosomes; aquestes s'ha detectat utilitzant una

combinació de CC i FISH en 18 casos (Gazzo et al., 2005) i una combinació de FISH i M-FISH en casos aïllats. (Wong, 1999; Gruszka-Westwood et al., 2002; Maravelaki et al., 2004)

Altres exemples són les translocacions $t(14;18)(q32;q21)$ i $t(8;14)(q24;q32)$, en les que els gens *BCL-2* i *MYC* són identificats com els oncogens implicats, respectivament. La translocació $t(14;18)(q32;q21)$ és una anomalia citogenètica força comú en els limfomes humans. Concretament, es troba en un 85% dels FL i en més d'un terç dels DLBCL. Per altra banda, la translocació $t(8;14)(q24;q32)$ és recurrent en BL, trobant-se en un 80% dels casos.

Altres translocacions impliquen la formació de proteïnes de fusió, com per exemple la translocació del gen *ALK* mapat a 2p23 amb diferents *partners*, essent el gen *NPM* el *partner* habitual, detectat en 80% dels casos amb la translocació (**Taula 3**).

La detecció d'aquestes translocacions, tant les que impliquen sobre-expressió de proto-oncogen com les que impliquen la formació d'un gen de fusió, té un gran valor a nivell diagnòstic, sobretot per a la detecció de la malaltia mínima residual. És per això que a nivell diagnòstic es realitzen de forma rutinària RQ-PCR o bé FISH per a la seva detecció.

Alteracions secundàries

A més d'aquestes translocacions, que acostumen a ser fenòmens primerencs, s'han descrit gran quantitat d'alteracions secundàries associades als diferents tipus de NHL, que en molts casos tenen un paper fonamental en la progressió i transformació histològica de molts d'aquests tumors.

La detecció d'aquestes alteracions secundàries, que acostumen a ser guanys, delecions o amplificacions de regions específiques i sovint també trisomies, ha permès no només obrir el camí a la identificació de gens associats a càncer sinó també la correlació amb les dades clíniques, permetent per tant, un diagnòstic diferencial i de vegades fins i tot, l'establiment un pronòstic determinat.

Existeix certa variabilitat a nivell de complexitat genètica entre els diferents limfomes; per una banda existeixen neoplàsies com les B-CLLs, amb poques alteracions cromosòmiques però recurrents (guanys del cromosoma 12 i pèrdues de 11, 13, 14 i 17p), en les que el fenòmens de progressió i transformació sovint impliquen un augment de la inestabilitat i en conseqüència un augment en el nombre d'alteracions. (Bea et al., 2002; Fernandez et al., 2008) Per altra banda, hi ha alguns NHL com els MCLs,

PMBCLs i els MMs que presenten inicialment, un gran nombre d'alteracions (**Taula 4**). (Salaverria et al., 2006)

Taula 4. Nombre d'alteracions cromosòmiques en NHL detectades per CGH (Salaverria et al., 2006)

Diagnòstic	% casos alterats	Nombre total alteracions/cas
MCL	89	4.2
MCL variant blastoide	100	10.1
B-CLL	63	2.5
B-CLL progressada (RS)	89	4.7
FL	68	2.2
MZL	81	2.3
DLBCL	75	3.4
PMBCL	88	4
MM	83	5.8

Malgrat la variabilitat, existeixen alteracions secundàries comuns entre els NHL (**Taula 5**). Per exemple, les alteracions de 3q són freqüents en diferents limfomes com per exemple MCL, MZL, DLBCL i MM amb freqüències d'aparició entre 25-70%. Les pèrdues de 6q també són freqüents en diferents NHL, ja que es troben en DLBCL, FL i MCL, de la mateixa manera que les pèrdues de 13q es troben en B-CLL, MCL i MM amb freqüències molt elevades; malgrat tot, és difícil en totes dues regions establir una regió mínima d'alteració, no només entre diferents tipus, sinó dins de cada grup. Recentment en B-CLL s'han localitzat els microRNAs⁴¹ miR-15a i miR-16-1 localitzats a 13q14.3 que presenten una desregulació deguda a la seva pèrdua. (Calin et al., 2007) Altres alteracions de regions en les que si s'han pogut limitar regions mínimes i són també recurrents en NHL són les pèrdues de 17p i 11q (regions mínimes 17p13 i 11q22-q23). La pèrdua de 17p13 la trobem en MCL, B-CLL, DLBCL, FL, MZL i DLBCL i està associada a pèrdues de TSG TP53. Mentre que les pèrdues de 11q22-q23 es troben freqüentment en MCL i B-CLL i estan associades al gen de reparació de dany *ATM*.

També existeixen alteracions que permeten discriminar entre subtipus d'una mateixa malaltia, com passa en els subtipus ABC i GCB de DLBCL, que no només presenten diferències en el patró d'expressió, (Alizadeh et al., 2000) sinó que també mostren

alteracions secundàries diferents, com són els guanys de 3q i 18q específics de ABC-DLBCL i els guanys de 2p14-p16 en GCB-DLBCL.(Bea et al., 2005) També s'observen alteracions que serveixen per a discriminar entre diferents entitats no sempre ben separades, com és el cas del PMBCL que presenten guanys de 9p, concretament de la regió mínima 9p21-pter,(Bea et al., 2005) amb una freqüència que arriba fins al 56%(Bentz et al., 2001) a diferència dels ABC i GCB-DLBCL en els que només es detecta en un 6% dels ABC-DLBCL i és absent en GCB-DLBCL (**Taula 5**).(Bea et al., 2005)

Taula 5. Alteracions cromosòmiques en NHL detectades per CGH		
Diagnòstic	Guanys/amplificacions (rang de freqüència %)	Pèrdues (rang de freqüència %)
MCL	3q (37-70)	1p (24-33)
	7p (4-27)	6q (13-37)
	8q (10-32)	8p (7-49)
	12q (4-30)	9p (7-30)
	18q (7-26)	11q (19-36)
		13q(32-63)
B-CLL		17p (4-30)
	12 (11-65)	11q (2-24)
		13q (11-65)
FL	X (13-47)	17p (4-32)
	1q (10)	1p (25)
	7 (10-21)	6q (7-21)
	12q (6-18)	17p (9-15)
	18 (14-29)	
MZL	X (24)	
	3/3q (31-52)	
	5q (28)	
	9q (21)	7q (14)
	12q (24)	17/17p (10-16)
	18 (32)	
DLBCL	20q (24)	
	X (12-49)	
	1q (11-38)	
	3/3q (11-27)	6 (14-38)
	7 (11-31)	8p (10-29)
	11(12-35)	17p (10-46)
ABC - DLBCL	12 (10-29)	
	18 (11-37)	
	1q (12)	6q16 (34)
	3q (26)	6q21-q22 (40)
GCB- DLBCL	7 (23)	17p (18)
	18 (34)	
	2p14-p16 (17)	
PMBCL	12p (16)	6q16 (21)
	12q (21)	6q21-q22 (22)
	Xp (16-33)	
	2p (18-47)	
	9p (37-56)	18q (9-16)
	12q (21-33)	

MM	1q (36)	
	3q (40)	13q (30-80)
	9q (10-40)	16 (12-17)
	11q (20-44)	19/19p (30)
	15q (10-48)	

REFERÈNCIES: **MCL:**{Bea, 1999 5 /id;Monni, 1998 4 /id;Bentz, 2000 17 /id;}(Martinez-Climent et al., 2001); Allen, 2002 15 /id; Jarosova, 2004 13 /id}; **B-CLL:**(Bentz et al., 1995;Karhu et al., 1997;O'Connor et al., 2000;Bea et al., 2002); **FL:**(Bentz et al., 1996;Avet-Loiseau et al., 1997;Viardot et al., 2002;Zhang et al., 2004); **MZL:** (Dierlamm et al., 1997;Hernandez et al., 2001);**DLBCL:** (Monni et al., 1996;Barth et al., 1998;Berglund et al., 2002;Karnan et al., 2004;Bea et al., 2004;Bea et al., 2005); **DLBCL ABC/GCB:**(Bea et al., 2005); **PMBCL:**(Bea et al., 2005;Bentz et al., 2001); **MM:** (Cigudosa et al., 1998;Gutierrez et al., 2001)

Alteracions secundàries en MCL

En el cas concret dels MCL diferents estudis utilitzant citogenètica convencional,(Cuneo et al., 1999;Wlodarska et al., 1998) CGH,(Monni et al., 1998;Bea et al., 1999;Bentz et al., 2000;Martinez-Climent et al., 2001;Allen et al., 2002;Jarosova et al., 2004) CGH array,(Kohlhammer et al., 2004;Schradars et al., 2005;Tagawa et al., 2005;Rubio-Moscardo et al., 2005) i SNP arrays,(Rinaldi et al., 2006)han mostrat que els MCL mostren una gran quantitat d'alteracions secundàries a banda de la t(11;14)(q13;q32) en les quals s'inclouen guanys de 3q, 7p, 8q, 12q i 18q i pèrdues de 1p, 6q, 8p, 9p, 9q, 11q, 13q i 17p (**Taula 6**). Aquestes alteracions cromosòmiques secundàries juguen un paper molt important en la limfomagènesi, alterant la regulació del cicle cel·lular o la resposta a dany genètic.(Fernandez et al., 2005) i han revelat que el MCL és una de les neoplàsies limfoides malignes amb més nivell d'inestabilitat genòmica (Taula 4).(Salaverria et al., 2006)

També s'han associat algunes alteracions amb el curs clínic en pacients amb MCL la majoria d'elles associades a pitjor pronòstic, menys les pèrdues de 1p21 les quals han estat associades a bon pronòstic(**Taula 7**). (Bea et al., 1999;Allen et al., 2002;Kohlhammer et al., 2004;Rubio-Moscardo et al., 2005)

Taula 6. Diferents alteracions observades per CGH i CGH arrays en MCL

Guanys CGH	Regió limitada per CGH	% casos alterats (Rang)- CGH	Regió limitada per CGH array	% casos alterats – CGH array
3q	3q25-q29	48 (37-70)	3q26	29
7p		25 (4-27)	7p21-p22	21
8q		25 (10-32)	8q21-q24	22
12q	12q13	23 (4-30)		
18q	18q21	21 (7-26)		16
Pèrdues				
CGH				
1p	1p13-p32	25 (24-33)	1p21-p31	34
6q	6q14-q27	29 (13-37)	6q21-q27	34
8p	8p21-p23	41 (7-79%)		45
9p	9p21-p24	23 (7-30)		28
9q		18 (3-20)		18
11q	11q21-q23	26 (19-36)	11q22-q23	32
13q ¹		45 (32-63)	13q14-q21	35
13q ²		45 (32-63)	13q32-q34	38
17p	17p13	22 (4-30)		24

REFERÈNCIES:(Bea et al., 1999;Monni et al., 1998;Bentz et al., 2000;Martinez-Climent et al., 2001;Allen et al., 2002;Jarosova et al., 2004)

Taula 7. Alteracions secundàries associades a pronòstic en MCL

Estudi	Nombre de casos	Tècnica	Mal pronòstic	Bon pronòstic
(Bea et al., 1999)	45	CGH	+3q,+12q, -9p	
(Allen et al., 2002)	30	CGH	+Xq, 17p	
(Kohlhammer et al., 2004)	53	CGH array	-8p, -13q14	
(Rubio-Moscardo et al., 2005)	68	CGH array	-9p, -9q21-q22, -17p13	-1p21

Estudis a nivell molecular han identificat en moltes d'aquestes regions alterades gens diana en la patogenèsi del MCL, com per exemple *PI6*^{INK4a} a 9p21, (Pinyol et al., 1998;Dreyling et al., 1997), *BMI-1* a 10p12,(Bea et al., 2001)*ATM* a 11q22.3,(Schaffner et al., 2000;Camacho et al., 2002;Greiner et al., 2006) *CDK4* a 12q14,(Hernandez et al., 2005) i *TP53* a 17p13 (**Figura 15**).(Hernandez et al., 1996;Greiner et al., 1996)

A nivell global, aquesta cerca de possibles gens localitzats a les regions alterades en MCL ha revelat que la majoria d'ells estan implicats en dos vies patogenètiques comuns: el cicle cel·lular i la resposta a dany del DNA. La correlació entre les dades moleculars i les dades clíniques ha permès comprovar que algunes alteracions estan específicament associades a alguna de les variants morfològiques de MCL. Els tumors molt proliferatius presenten alteracions a les dues vies principals, la *INK4a-CDK4-RB1* i *ARF-MDM2-TP53*, que són responsables del control del cicle cel·lular i la senescència. Com ja s'ha comentat, dos elements reguladors claus de CDK4 i TP53, anomenats *INK4a* i *ARF* estan localitzats al locus 9p21, una regió delecionada en un 20-30% de les variants altament proliferatives però en menys d'un 5% dels casos de variant típica. Finalment, les mutacions de *TP53* associades a delecions de 17p, es troben rarament en variants clàssiques de MCL, però són freqüents (30%) en les variants agressives associades a una alta proliferació i un pitjor pronòstic (**Figura 15**). (Hernandez et al., 1996; Greiner et al., 1996)

Una estratègia recent utilitzant *non sense mediated decay pathway*⁴² juntament amb arrays d'expressió, ha detectat microdelecions del gen *RB1* amb una manca de la proteïna com a resultat, en alguns MCL altament proliferatius. Aquesta alteració té lloc en casos amb *P16^{INK4a}* normal suggerint que la presència de dos alteracions dins d'una mateixa via no aporta avantatges addicionals per a les cèl·lules tumorals. (Pinyol et al., 2007)

També s'han observat amplificacions i sobre-expressions del locus de la família del grup Polycomb⁴³, *BMI-1* en alguns casos de MCL. Aquest gen sembla tenir un paper en la regulació del cicle cel·lular i de la senescència actuant com a repressor de *P16^{INK4a/ARF}*, per tant, sembla ser que podria tenir un paper en la patogènesi d'alguns MCLs. (Bea et al., 2001)

Per altra banda, s'ha vist també que la inactivació d' *ATM* en cèl·lules verges del mantell pot facilitar el desenvolupament de la inestabilitat genòmica i un augment de la tumorogènesi en estadis inicials. Les mutacions d'*ATM* s'han descrit en un 40-75% dels MCLs i generalment estan associades a la pèrdua de l'altre al·lel. Les mutacions afecten principalment al domini PIK3⁴⁴ i donen lloc a proteïnes truncades que són inestables i es degraden de forma ràpida. (Schaffner et al., 2000; Camacho et al., 2002; Fang et al., 2003) El fet que les alteracions d'*ATM* es donin en una freqüència similar en totes les variants citològiques de MCL indica que les alteracions en aquest gen són un fenomen

molt inicial o bé un fenomen que implica predisposició en aquest tipus de tumors (**Figura 15**).

Juntament amb *ATM* altres elements de resposta al dany al DNA estan alterats de forma ocasional en MCL com *CHK1* i *CHK2*. L'absència d'expressió de *CHK2* ha estat associada a un nombre elevat d'alteracions genètiques, mentre que només s'han identificat de forma puntual alteracions de l'expressió de *CHK1*.(Tort et al., 2002;Tort et al., 2005)

També s'ha vist que l'expressió alterada de factors de llicència per a la replicació del DNA (*DNA replication licensing factors*) està associada a més quantitat d'alteracions secundàries i a defectes en els *checkpoints* en MCL, justificant el perquè aquest tipus de tumors toleren l'inestabilitat genòmica (**Annex 9**). (Pinyol et al., 2006) Finalment també el gen *AURKA* és un gen localitzat a la regió 20q13.2-q13.3 i codifica per una kinasa reguladora de cicle que està implicada en la formació de microtúbuls i en l'estabilització centrosomes durant la segregació dels cromosomes. En MCL s'ha observat que la sobre-expressió d'aquest gen també pot contribuir a les alteracions numèriques de forma ocasional en MCL. (**Annex 10**). (Camacho et al., 2006)

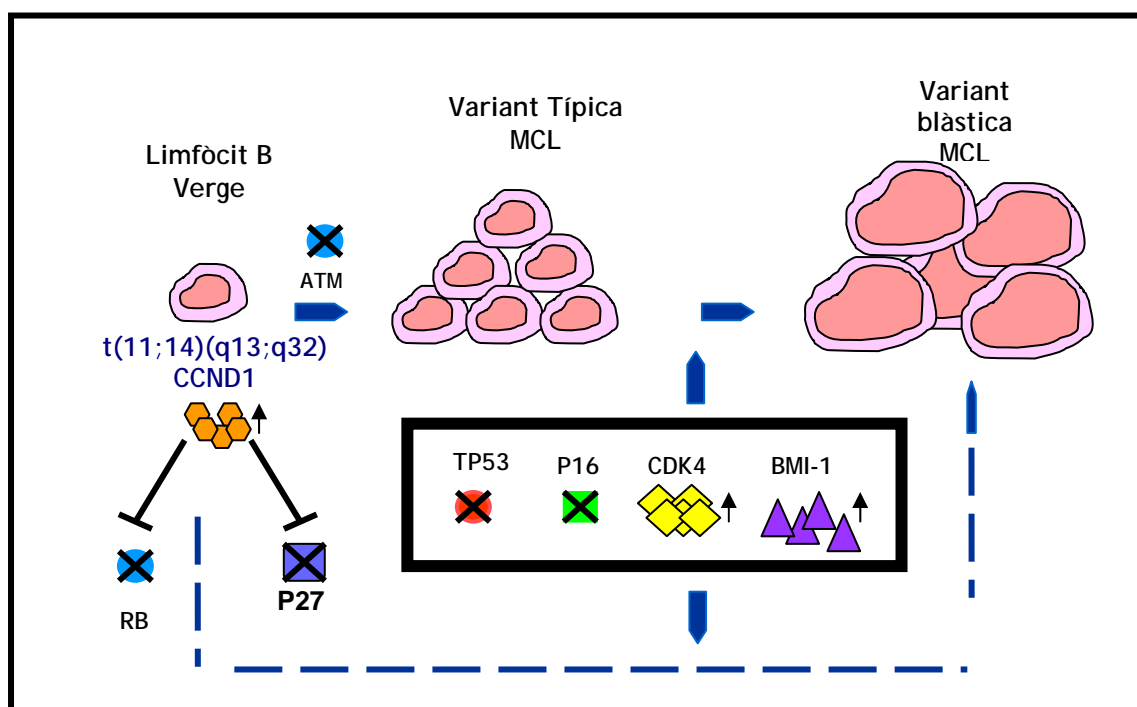


Figura 15. Gens implicats en la formació i progressió dels MCL

MATERIAL I MÈTODES

Protocol CGH

Preparar la reacció de *nick translation*⁴⁵

1- En un tub de microcentrífuga Eppendorff afegir:

(20.5 -x) µl d'H₂O nuclease-free

x µl de DNA (800 ng)

5 µl de 0.1 mM dTTP (10 µl de 0.3 mM dTTP + 20 µl d'H₂O nuclease-free)

10 µl de 0.1 mM dNTP mix (10µl de cada de 0.3 mM dATP, dCTP i dGTP)

2,5 µl de 0.2 mM Spectrum Green o ½ Red-dUTP (10 µl de 1mM dUTP + 40 µl d'H₂O nuclease-free)

5 µl de 10X *Nick Translation Buffer*

7 µl de *Nick translation enzyme* (últim i mantenint en gel)

(Volum total 50 µL)

2- *Vortex*⁴⁶ i *spin*⁴⁷ de centrífuga

3- Deixar la reacció de nick: 1h-1h 15min al bany a 16 °C

4- Parar la reacció: 10 min al bany a 70 °C

5- Còrrer 5 µl de cada tub + 5 d' H₂O i 3 µl Blue Juice 5X en un gel d'agarosa 1% (80 ml de TBE 1X, 0.8 g d'agarosa, 8 µl de bromur d'etidi)

(El smear⁴⁸ ha de quedar entre 300 i 3000 bp o menys), si està correcte parar la reacció.

6- Deixar tubs en gel o nevera uns minuts

Preparar solució desnaturalitzant pH 7 (45 mL formamida+ 5 ml 20X SSC (pH 5.3)

(66 g. 20X SSC + 200 ml d' H₂O, ajustar a pH 5.3 amb HCl, ajustar a volum final 250 mL i filtrar)+10 ml d' H₂O milli-Q⁴⁹) i escalfar a 70 °C

Precipitar sondes

1- Barrejar DNA control i DNA tumor marcats en un mateix tub

2- Afegir 10 µ DNA Cot-1 humà (10 ng)

3- Afegir 0.1 volums de NaAc 3M

4- Afegir 2.5 volums d'etanol 100% fred i invertir

5- Deixar precipitar >15 min en gel o al congelador -20°C

6- Centrifugar 30 min a 12000 RPM a 4°C

7- Descartar sobrenedant, passar paper o turunda per parets del tub i deixar evaporar alcohol a l'estufa a 37 °C, cap per avall fins que quedi sec del tot. (15 min)

- 8- Resuspèndre pel·let a l'agitador en 12 µl de solució A (50% formamida desionitzada + 50% master mix) MASTER MIX: 20 % dextrà sulfat (2 g de Dextrà sulfat, 1 ml de 20x SSC i 9 ml d' H₂O milli-Q)
- 9- *Vortex i spin* de centrífuga

Preparar metafases

- 1- Fer ratlla al mig del portaobjectes amb llapis de diamant per a separar el portaobjectes en dos regions d'hibridació (2 casos per cada portaobjectes).
- 2- Desnaturalitzar 6 min en solució desnaturalitzant a 72 °C
3. Deshidratar: 1-2 min en etanol 70% fred (Conservar els alcohols a -20°C)
 - 1-2 min en etanol 90% fred
 - 1-2 min en etanol 100% fred
- 4- Deixar secar a T.A.

Preparar hibridació

- 1- Desnaturalitzar sonda 6min a 72 °C
 - 2- Tirar la sonda sobre portaobjectes, una gota a cada meitat i cobrir amb cobreobjectes (24x24mm) cadascuna de les meitats de la preparació
 - 3- Segellar tot el voltant del cobreobjectes perquè no s'evapori
- Deixar hibridar dins una cambra fosca i humida 36-72 hores a l'estufa a 37 °C

Rentats post-hibridació

- 1- Treure la goma i el cobreobjectes del portaobjectes
- 2- Netejar el portaobjectes durant 2 min en sol·lució 0.4X SSC/0.3% tween-20 (10 ml de 20X SSC + 475 ml d' H₂O + 1.5 ml de NP-40, ajustar a pH 7 amb NaOH, ajustar a volum final 500 ml)
- 3- Netejar 2 min en sol·lució 2X SSC/0.1% tween-20 a temperatura ambient (50 ml de 20X SSC + 425 ml d' H₂O + 0.5 ml de NP-40, ajustar a pH 7 amb NaOH; ajustar fins a un volum final de 500 ml)
- 4- Deixar assecar
- 5- Afegir 12 µl de DAPI II (Vysis) a cada meitat del portaobjectes
- 6- Cobrir amb un cobreobjectes (24x60mm)

Protocol de cultiu de sang perifèrica

1- Es prepara un flascó que conté 8 ml de medi Chang, 0.8 ml de sang perifèrica i 100 µl de TPA*

2- Un cop preparat els flascó es deixa a l'estufa a 37 °C al 5% de CO₂, mig obert durant 72h.

*En el cas de cultiu de gangli o melsa es preparen 1-1.5 ml de mostra amb una concentració $\geq 15 \times 10^6$ cel/ml en 5 ml de medi Chang amb complementat amb TPA

Protocol de cultiu de moll d'os

1- En el cas del cultiu de MO un cop arriba el MO es centrifuga a 1800 rpm durant 7 min.

2- Amb una pipeta es travessa el sobrenedant i s'aspira la capa més blanquinosa i superficial agafant també uns quants hematies fins arribar a 0.5 ml i es posa a cultivar en 8 ml de medi Chang complementat amb TPA (100 µl) a 37° al 5% de CO₂, amb el tub mig obert durant 72h

Protocol de cultiu de cèl·lules criopreservades

Descongelació i cultiu

1-Descongelem les cèl·lules criopreservades al bany de 37 °C durant uns minuts i en agitació.

2-Calcullem les cèl·lules totals (milions/ml)

3-Diluïm les cèl·lules en 8ml de medi

4-10 min a 1000 RPM

5-Treiem el sobrenedant amb el xuclador

6-Diluïm el pellet en un flascó de 5ml de medi complementat amb TPA (100 µl)

7-Calcullem que quedi a una concentració de 2×10^6 /ml

8-Deixem 72 h a l'estufa a 37 °C al 5% de CO₂ (tub mig obert)

Processament del cultiu i preparació de les extensions

- 1- Passades les 72h s'afegeixen 100 µl de Colcemid i es deixa el flascó a l'estufa durant 50 min (30 min en moll d'os)
- 2- Es passa el cultiu a un tub de plàstic i es centrifuguen les cèl·lules a 1500 RPM durant 5 min
- 3- Es treu el sobrenedant (amb l'aspirador) i es resuspen el botó cel·lular amb l'agitador alhora que afegim 7-10 ml de solució hipotònica KCl 0.075 M (2.76 g en ½ l) pre-escalfada a 37°, deixant-se actuar durant 15 min al bany a 37°C
- 4- Es centrifuga a 1500 RPM durant 5 min
- 5- Es treu el sobrenedant i es resuspen el botó cel·lular amb l'agitador alhora que es va afegit Carnoy (Metanol:acètic 3:1) a temperatura ambient fins a 10ml i agitant bé el tub.
- 6- Es centrifuga a 1500 RPM durant 5 min
- 7- Es treu el sobrenedant i es resuspen el botó (repetir 2 cops)
- 8- Quan el botó està net s'afegeixen unes gotes de Carnoy fresc fins a la concentració adequada.
- 9- Es fan marques amb llapis de diamant per emmarcar la gota i es deixar anar la gota sobre el portaobjectes des de certa altura (30 cm aproximadament)
- 10- Es deixa envellir els porta *over night* (ON) dins l'estufa a 60°C o a temperatura ambient (Si és tot el cap de setmana)

Protocol de Bandes G

- 1- Preparem tinció de bandes G (Buffer:Wright 3:1) (Buffer Wright: 4.53 g.de KH_2PO_4 i 5.93 g.de NaHPO_4 enrasat a 1l/ Tinció Wright: 2.5 g de Wright diluïts en 1l de metanol)
- 2- Posem 4 ml de la preparació sobre cadascun dels portaobjectes intentant cobrir tota la superfície d'aquest i deixem tenyir entre 1 i 2 min (variable).
- 3- Treiem el colorant decantant el portaobjectes i aclarem sota un raig d' H_2O per les dues bandes i sequem amb paper de filtre
- 4- Es comprova que la preparació ha quedat ben tenyida i si ha quedat un bandejat molt suau es torna a tenyir i si ha quedat molt tenyit es destenyeix amb fixador (Àcid Acètic/ Metanol, 3:1) i si es torna a repetir el procés amb menor temps de tinció.

Protocol de FISH

- 1- Es col·loquen el portaobjectes durant 30 min en 2X SSC a 37°
- 2- Es passa el portaobjectes a la bateria d'alcohols del 70, 85 i 100% durant 1 min
- 3- Sequem el portaobjectes a la placa

- 4- Passem 5 min en solució desnaturalitzant a 72°
- 5- Posem el portaobjectes 1 min en alcohols de 70, 85 i 100% freds
- 6-Sequem portaobjectes
- 7-Escallem 10 µl de sonda 5 min a 72 °C (De forma estàndard: 1 µl de sonda, 7 µl de buffer d'hibridació i 2 µl d' H₂O nuclease-free).
- 8-Apliquem la sonda sobre el portaobjectes, cobreobjectes, segellem i a la cambra humida 24h a 37°C.
- 9-Passades 24 h realitzem els rentats post-hibridació (2 min en 2X SSC T.A i 2 min en 0.4X SSC a 70°C) (Veure la preparació dels reactius al protocol CGH).

Protocol de M-FISH

- 1- Posem el portaobjectes amb les extensions metafàsique 30 min en 2x SSC a 37°C
- 2- 5 min en Pepsina 69.3ml d'H₂O+ 0.7 ml d'HCl en 35µl
(0,1 g de Pepsina o Proteinasa K +1ml d'H₂O- al·lòtotes de 35 µl a -20^a) a 10% a 37%
- 3- Posem el portaobjectes 5 min en 1X PBS a room temperature (RT) 2 min en Formaldehid per a fixar a RT (57.6 ml d'H₂O + 3.5ml MgCl₂ al 1 M + 7ml 10x PBS +1.89 ml Formaldehid al 37%;volum total 70 ml)
- 4- 2 rentats en 1X PBS de 5 min a RT (20ml de PBS 10X + 180ml d'H₂O; volum total 200ml)
- 5- Deshidratació en etanol 70%, 85% i 100% freds durant 1 min
- 6- Sequem el portaobjectes a la placa
- 7- 5 min en solució desnaturalitzant
- 8- Posem 10 µl de sonda a escalfar a 70 °C
- 9- Deshidratació en etanol 70%, 85% i 100% freds durant 1 min
- 10- Sequem el portaobjectes a la placa
- 11- Posem la gota de sonda on hi hagi metafases (regió marcada prèviament) posem el cobreobjectes (24x24mm) i segellem amb cola al voltant per evitar evaporació
- 12- Col·loquem el portaobjectes dins d'una capsula (cambra humida) a 37°C durant 24 h
- 13- Passades 24 h realitzem els rentats post-hibridació (2 min en 2XSSC RT i 2 min en 0.4XSSC a 70°C) (Veure la preparació dels reactius al protocol CGH)

Protocol de CGH array

Dia 1: Marcatge

- 1- Marcatge de 300ng/ μ l Dna amb Cy3 els tumors (verd) Cy5 els controls (vermell) amb Random primer.
- 2- Incubació a 37°C ON

Dia 2: Purificació

- 1- Parar la reacció amb Stop Buffer
- 2- Purificar utilitzant Spin-Columns (Pharmacia Amersham)
- 3- Comprovar que el marcatge a sortit bé mitjançant l'espectre o bé corrent els productes en un gel d'agarosa.

Precipitació

- 1- Ajuntar tumor i normal i precipitació
- 2- Preparar un segon tub (tub 2) per evitar la hibridació inespecífica, que conté Cot i esperma de Salmó i també el precipitar
- 3- Precipitació ON -20°C o 1 h a -80°C
- 4- Preparar els buffer de pre-Hibridació i d'hibridació i posar a escalfar
- 5- Resuspèndre els pellets en buffer d'hibridació Fer la pre-hibridació afegint el contingut del tub 2 al portaobjectes prèviament preparat per la hibridació (marcs per aguantar el volum de la hibridació)
- 6- Col·locar el portaobjectes en una cambra amb solució de pre-hibridació
- 7- Treure la pre-hibridació tub 2
- 8- Posem la hibridació afegint el contingut del tub 1
- 9- Col·locar el portaobjectes en una nova cambra amb solució d'hibridació i posar a l'estufa a 37°C durant 48 h

Dia 3: Rentats post-hibridació

- 1- Rentat 10 min en rotació en PBS/0.05%Tween 20
- 2- Rentat 60 min en 50% Formamida/0.5X SSC
- 3- Repetir primer rentat
- 4-Centrifugar a 1500 RPM durant 5 min per a secar el portaobjectes

Dia 4: Escanejat

- Escanejat del portaobjectes amb l'scanner AXON 4000B

Pautes:

- Els ratios de fluorescència són calculats després de l'eliminació del background mitjançant el software GenePix Pro 4.1

- Els spots són descartats sempre que la intensitat sigui més baixa que el doble de la intensitat mitjana dels clons de *Drosophila Melanogaster*⁵⁰
- Els ratios són calculats i normalitzats utilitzant el valor mitjà dels clons dels cromosomes autosòmics.
- Les intensitats dels triplicats són comparades amb la intensitat mitjana del triplicat i descartats en cas que variïn un 10% de la mitjana.
- Els ratio final és la mitja dels ratios dels replicats sempre i quan hi hagi com a mínim 2 replicats no descartats.
- Els llindars de guany i pèrdua s'han establert en 0.26 pel guany i -0.32 per la pèrdua (valors en log₂).

Protocol PCR quantitativa

1- Dissenyar plantilla (2 controls a cada placa), triplicat de cada cas i triplicat de control negatiu.

2- Fer MIX a la campana sense gel, micropipetes automàtiques, puntes cotó

Mix en cada pouet per sondes *no-assay by design*:

Reactiu	ALB (µl)	TP53 (µl)
MMIX	12.5	12.5
primer F (10 µm)	2.25	0.5
primer R (10 µm)	0.125	0.5
TaqMan Probe	0.5	0.5
H ₂ O	7.62	9

Mix en cada pouet per sondes *assay by design*

Reactiu	B2M/ATM
MMIX	10
ASSAY	1
H ₂ O	7

3- Repartir MIX, 23/ 28 µl per pouet.

- 4- 2 μL DNA (a 10 ng/ μl) a cada pouet
- 5- Anar tapant les files amb els taps utilitzant pinces i sempre amb el guants nets amb alcohol per evitar que la pols del guant no deixi passar la fluorescència a través del tap
- 6- Col·locar placa al suport de 7700 Quantative PCR
- 7- Obrir làser
- 8- Obrir software Sequence Detector
- 9- Introduir disseny de la placa. *Sample Type Setup*. STD, UNK, NTC amb FAM (per defecte)
- 10- Thermal Cycle conditions: 25/28 μl
- 11- Un cop passat el programa (2h aproximadament), FAM, seleccionar tot i clicar a *Show analysis* i *Run*.

Reactius**Taula 7.** Taula de reactius utilitzats

Nom del reactiu	Composició	Tècnica	Casa comercial	Referència
Nick translation kit	10X Nick translation Buffer, dTTP, dCTP, dATP, dGTP Nuclease free water, Nick translation enzyme	CGH	CGH Nick translation Kit -Vysis	Cat.53232-801300
DAPI II counterstain	4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrat	CGH	Vysis	Cat. 53232-804831
DAPI III counterstain	4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrat	CGH	Vysis	Cat.32-804932
CGH Target Slides- 5 Slides		CGH	Vysis	Cat. 53232-806010
Spectrum Green d-UTP		CGH	Vysis	Cat.53230-803200
Spectrum Red d-UTP		CGH	Vysis	Cat.53230-803400
Formamida	CH ₃ NO/HCONH ₂	CGH	Sigma-Aldrich	Ref. 47670
Cot-DNA		CGH	Vysis	Cat.1.581.074
RNase DNase free		CGH	Boehringer-Mannheim	Ref. 1119915
20X SSC		CGH	Roche	Cat. 1 666 681
M-FISH probe		M-FISH	Vysis	Cat. 32-120099
RPMI 500 ml		Cultiu cel·lular	Cambrex	ref. 12-702F
Medi Chang		Cultiu cel·lular	Irvine Scientific	91004
TPA	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetat	Cultiu cel·lular	Sigma	P8139
Colcemid		Parada divisió cel·lular	Gibco	15210-040
W300 Wright stain	Blau Eosin Metilè	Tinció bandes G	Sigma	2735415
t(11;14) <i>dual color</i>		FISH	Vysis	32-231031
LSI <i>ATM</i> /CEP11		FISH	Qbiogene (Durviz)	PONC1111
LSI <i>CCND1</i>		FISH	Vysis	30-191039
WCP Y		FISH	Vysis	32-122024

WCP 19		FISH	Vysis	32-120019
CEP 8 Spectrum Orange		FISH	Vysis	30-160008
Kit d'extracció de DNA		Extracció de DNA	Qiagen	Ref. 51304
DNA mini kit				
Sonda <i>ATM</i> - Assay by design		RQ-PCR	Applied Biosystems	Disseny propi
Sonda <i>B2M</i> -Assay by design		RQ-PCR	Applied Biosystems	Disseny propi
Sonda <i>TP53</i> FAM		RQ-PCR	Sigma Genosys	Disseny propi
Primer Forward – <i>TP53</i>		RQ-PCR	Sigma Genosys	Disseny propi
Primer Reverse- <i>TP53</i>		RQ-PCR	Sigma Genosys	Disseny propi
Sonda <i>ALB</i> FAM		RQ-PCR	Sigma Genosys	Disseny propi
Primer Forward – <i>ALB</i>		RQ-PCR	Sigma Genosys	Disseny propi
Primer Reverse- <i>ALB</i>		RQ-PCR	Sigma Genosys	Disseny propi
Primer Reverse <i>ALB</i>		RQ-PCR	Sigma Genosys	Disseny propi
Microamp AB		RQ-PCR	Applied Byosystems	4306737
Optical Caps		RQ-PCR	Applied Byosystems	4323032
Bioprime Labelling kit	Random primers, dNTPs, Cy3dUTP, Cy5dUTP, Klenow enzyme	CGH arrays	Invitrogen	18095-011
Micro-spin G50 columns		CGH arrays	Pharmacia Amersham	275330-01
Human Cot 1 DNA		CGH arrays	Invitrogen	15279-011
Salmon testes DNA		CGH arrays	Sigma	D-9156
Yeast tRNA		CGH arrays	Invitrogen	15401-011
Humidity chambers		CGH arrays	CAMLAB	RTP/7870

Aparells**Taula 8.** Taula d'aparells utilitzats

Nom de l'aparell	Marca	Utilitat
Bany fred	Selecta	CGH
Centrífuga 5402	Eppendorf	CGH
Estufa 37°C	Memmert	Hibridació- CGH, M-FISH, FISH
Bany humit	Selecta	Parar reacció de CGH, escalfar Formamida i solucions de rentat
Agitador Rotabit	Selecta	Per resuspendre DNA co-precipitat en solució A (CGH)
7700 Quantative PCR	Applied Biosystems	RQ-PCR
Sistema Milli-Q	Millipore	Obtenció d'aigua desionitzada
ND-1000 espectyrophotometer	Nanodrop	Quantificació de DNA
Bany sec	Selecta	Procés de purificació DNA (RNase)
Campana de flux cultiu	Magnehelic	Cultius cel·lulars
ISIS digital image analysis system 5.0	Metasystem	Software per a la captura de M-FISH, FISH
Cytovision Ultra station 3.6	Applied Imaging	Software per a la captura de Cytovision
AXONGenePix 4000B scanner	Axon	Escàner per a la l'escanejat de CGH-arrays
GenePix Pro 4.1	Axon	Software per a l'escanejat d'CGH-arrays
Microscopi de fluorescència	Leica	Captura de CGH
Microscopi de fluorescència	Olympus	Captura de FISH i M-FISH
Campana de flux	Euroaire	Realització de PCR Quantitativa

OBJECTIUS

Objectiu general:

L'objectiu general d'aquesta tesi doctoral és estudiar les alteracions secundàries, tant numèriques com estructurals, que presenten els limfomes de cèl·lules del mantell (MCL) així com estudiar l'influència d'aquestes alteracions en l'expressió dels gens situats en les regions alterades i en la supervivència dels pacients que les presenten.

Objectius concrets:**1. Estudiar alteracions cromosòmiques en els MCL**

- Determinar les alteracions secundàries nivell numèric mitjançant tècniques com mCGH i CGH array.
- Determinar les alteracions estructurals en MCL utilitzant M-FISH i FISH i determinar l'existència de possibles translocacions recurrents, a més a més de la t(11;14)(q13;q32).
- Identificar, mitjançant l'estudi citogenètic-molecular, els punts de trencament recurrents en MCL els quals poden contenir gens rellevants que poden tenir un paper important en la patogènesi dels MCLs o poden estar associats a punts fràgils.
- Determinar la influència d'aquestes alteracions secundàries en l'expressió dels gens situats en les regions alterades per tal d'identificar possibles dianes dels guanys i pèrdues recurrents en MCL.
- Determinar la importància a nivell pronòstic d'aquestes alteracions genètiques

2. Caracterització de línies cel·lulars de MCL que serveixen com a models experimentals

- Estudi de les alteracions secundàries i punts de trencament de les línies cel·lulars derivades de MCL
- Determinar els patrons de inestabilitat i l'heterogeneïtat a nivell cromosòmic de les línies cel·lulars derivades de MCL.

3. Estudi d'alteracions secundàries de MCL amb leucemització

- Elucidar si existeixen diferències en el patró d'alteracions cromosòmiques en funció de si els pacients amb MCL presenten o no leucemització.

RESULTATS

TREBALL N°1

**Alteracions genòmiques i patrons de variabilitat en el cariotip
en línies cel·lulars de Limfoma de Cèl·lules del Mantell
(Leukemia Research 30:923-924, 2006)**

Alteracions genòmiques i patrons de variabilitat en el cariotip en línies cel·lulars de Limfoma de Cèl·lules del Mantell

Els limfomes de cèl·lules del mantell estan genèticament caracteritzats per translocacions del locus 11q13 que conté el gen *CCND1*. Hem caracteritzat 5 línies cel·lulars de mantell, JVM-2, GRANTA-519, REC-1, JEKO-1 i NCEB-1 combinant les tècniques de CGH sobre metafase, CGH arrays i anàlisis moleculars. Els nostres resultats revelaven guanys comuns de les regions: 2p14, 9q31.2-qter, 11q13.1-q21, 13q14-q21.2, 13q34-qter i 18q21.1-q22.1, i pèrdues de 1p21.2-p31.1, 2p11.2, 8p21.2-pter, 9p21.3-pter, 11q23.3-qter, 17p11.2-pter i 17q21.2-q22.2. Totes les línies cel·lulars excepte JVM-2 presentaven un grau moderat o elevat d'inestabilitat cromosòmica de tipus numèric. A més, REC-1 mostrava una generació de reorganitzacions cromosòmiques continua que provoca l'aparició d'alteracions cromosòmiques no clonals, la majoria de les quals no es fixen en el cariotip.. De forma sorprenent NCEB-1 presentava diversos cromosomes de ratolí en el seu cariotip i mostrava expressió tant de la proteïna BCL-2 humana com de la murina. Els nostres descobriments indiquen que aquestes línies cel·lulars presenten tres patrons diferents d'evolució cromosòmica en els MCL que poden ser útils per comprendre la patogènesi d'aquesta neoplàsia.

Genomic imbalances and patterns of karyotypic variability in mantle-cell lymphoma cell lines

Jordi Camps^{a,1}, Itziar Salaverria^{b,1}, Maria J. Garcia^c, Esther Prat^a, Sílvia Beà^b,
Jessica C. Pole^d, Lluís Hernández^b, Javier Del Rey^a, Juan Cruz Cigudosa^e,
Marta Bernués^f, Carlos Caldas^c, Dolors Colomer^b,
Rosa Miró^a, Elías Campo^{b,*}

^a *Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia and Institut de Biotecnologia i de Biomedicina, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain*

^b *Departament d'Anatomia Patològica, Secció d'Hematopatologia Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques "August Pi i Sunyer" (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain*

^c *Department of Oncology, Cancer Genomics Program, Hutchison/MRC Research Centre, University of Cambridge, Cambridge CB2 2XZ, United Kingdom*

^d *Department of Pathology, Cancer Genomics Program, Hutchison/MRC Research Centre, University of Cambridge, Cambridge CB2 2XZ, United Kingdom*

^e *Cytogenetics Unit, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), Melchor Fernández Almagro 3, 28029 Madrid, Spain*

^f *Servei de Genètica, Hospital Universitari Son Dureta, Andrea Dòria 55, 07014 Palma de Mallorca, Spain*

Received 20 July 2005; received in revised form 7 November 2005; accepted 18 November 2005

Available online 31 January 2006

Abstract

Mantle-cell lymphoma (MCL) is genetically characterized by 11q13 chromosomal translocations involving the *CCND1* gene. We have characterized five MCL cell lines, JVM-2, GRANTA-519, REC-1, JEKO-1, and NCEB-1, combining metaphase and array comparative genomic hybridization, multicolor-FISH, and molecular analysis. Our results revealed common gained regions at 2p14, 9q31.2–qter, 11q13.1–q21, 13q14–q21.2, 13q34–qter and 18q21.1–q22.1, and losses at 1p21.2–p31.1, 2p11.2, 8p21.2–pter, 9p21.3–pter, 11q23.3–qter, 17p11.2–pter, and 17q21.2–q22.2. All cell lines except JVM-2, displayed moderate or high numerical chromosome instability. In addition, an ongoing level of chromosome rearrangements was observed in REC-1. Surprisingly, NCEB-1 carried several stable mouse chromosomes and showed expression of both human and murine bcl-2 protein. Our findings indicate that these cell lines represent three patterns of chromosome evolution in MCL and may be useful to understand the pathogenesis of this neoplasm.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Mantle-cell lymphoma; Chromosomal instability; Cell lines; Comparative genomic hybridization; Multicolor-FISH; Cell cross-contamination; Cell fusion

1. Introduction

Mantle-cell lymphoma (MCL) is an aggressive lymphoid neoplasm genetically characterized by chromosomal translocations involving the 11q13 region and its molecular counter-

part *BCL-1* rearrangement, which results in the overexpression of *CCND1* gene [1,2]. Experimental studies have shown that *CCND1* can function as an oncogene but its tumorigenic and transforming properties seem to be less effective than other oncogenes [3], suggesting that other mechanisms may participate in the development and progression of MCLs. Different studies using conventional cytogenetics [4,5], comparative genomic hybridization (CGH) [6–10], and array-based CGH [11–13] have shown that MCLs carry high number of

* Corresponding author. Tel.: +34 93 227 5450; fax: +34 93 227 5717.

E-mail address: ecampo@clinic.ub.es (E. Campo).

¹ The authors contributed equally to this study.

chromosomal alterations. Metaphase and array CGH analyses have been very useful to define common chromosomal regions with changes in the copy number. In addition, M-FISH is a very powerful tool that facilitates the karyotyping of tumor genomes and allows the identification of complex chromosomal rearrangements, cryptic translocations, and marker chromosomes undetectable by conventional cytogenetics providing a more precise quantification of intermetaphase heterogeneity.

Genetic instability is a common feature of malignant neoplasms and it is frequently characterized by numerical chromosome abnormalities and structural rearrangements [14,15]. The spectrum of secondary aberrations in lymphomas may be influenced by the nature of the tumor. Some tumors undergo marked chromosome rearrangements whereas others may evolve by mechanisms that confer little chromosomal changes, resulting in different rates of chromosomal evolution. To obtain a global overview of the genomic instability and complex chromosomal alterations in these tumors may require the combined use of different cytogenetic approaches that cover all numeric and structural aberrations. Unfortunately, this thorough cytogenetic approach is difficult to perform in primary tumors due to the limited amount of material obtained in clinical samples. Lymphoid cell lines are a good in vitro model that may facilitate the analysis of complex karyotypes and patterns of genomic instability providing helpful information to understand the mechanisms involved in the pathogenesis of these tumors.

In this study we have examined a series of MCL derived cell lines using a combined analysis of metaphase and array-based CGH and M-FISH. Our findings reveal a number of new chromosomal breakpoints and rearrangements in MCL and, in addition, they indicate that MCL as well as solid tumors may present different patterns of chromosomal instability. One of the cell lines examined, NCEB-1, carried several stable mouse chromosomes.

2. Materials and methods

2.1. Cell lines

The four MCL-derived cell lines GRANTA-519 (DSMZ, Braunschweig, Germany), REC-1 (kindly provided by Dr. Bastard, Rouen, France), JEKO-1 (DSMZ, Braunschweig, Germany), NCEB-1 (kindly provided by Dr. Nielsen, Copenhagen, Denmark and Dr. M Raffeld, NIH, Bethesda, MD, USA), and the B-prolymphocytic leukemia (B-PLL) derived cell line JVM-2 (DSMZ, Braunschweig, Germany), harboring the t(11;14), were examined in the study. Several studies have suggested that B-PLL is not a specific disease entity but a blastic variant of different lymphoid neoplasm. Cases carrying the t(11;14) translocation correspond most probably to blastoid variants of MCL [16–18]. Cells were grown in RPMI 1640 containing L-glutamine (Gibco, Paisley, Scotland, UK), except GRANTA-519 that was grown

in DMEM medium (Gibco). All culture media were supplemented with 10–20% heat-inactivated fetal bovine serum, penicillin-streptomycin (50 µg/ml, Gibco), and L-glutamine (2 mM, Gibco). All the cell lines were grown in a 5% carbon dioxide and 98% humidity atmosphere at 37 °C. The doubling time ranged from 24 to 48 h, and the cells were split twice a week.

2.2. mCGH and aCGH

Metaphase CGH [19] hybridization, and digital image acquisition, processing, and evaluation were performed as previously described [7,20].

Custom made BAC arrays providing tiling path resolution at the 8p12 region (54 clones), 1–1.5 Mb coverage for chr.8 (82 clones) and 10 Mb coverage for the rest of the genome (285 clones) were used [21]. A set of clones containing “cancer-related” genes (34 clones) were also included as well as *Drosophila* clones (6 clones) as controls for non-specific hybridization. All the human clones were BACs from the RP11 library selected from the 1 Mb clone set provided by the Wellcome Trust Sanger Institute (Hinxton, UK). *Drosophila* BAC clones were obtained from the RPCI-98 library (<http://www.chori.org/bacpac/>). The protocols for the array generation as well as those used for the DNA labeling and hybridization have been previously described [22]. Arrays were scanned using an Axon 4000B scanner (Axon Instruments, Burlingame, CA, USA). Fluorescence ratios were calculated after background subtraction using GenePix Pro 4.1 software and the fluorescent intensities were imported into an Excel spreadsheet. Spots with intensity below twice the median intensity of the *Drosophila* clones were rejected. Test/Reference ratios were then calculated and normalized to the median ratio of the autosomal chromosome clones. Spots with ratios more than 10% different from the median of the triplicates were rejected. If a minimum of two spots of the triplicates were accepted the mean of the log₂ ratios was calculated and plotted against position in the chromosomes. Clones were ordered according to the University of California-Santa Cruz (UCSC) Build34 of the Human Genome Sequence. The capacity of the array to resolve copy number alterations up to the level of single copy change was assessed by setting up appropriate control hybridizations using normal male and female DNA pools as well as DNA from well characterized cell lines.

2.3. Fluorescence in situ hybridization

M-FISH assay [23] hybridization procedure was performed following the Vysis protocol (Vysis, Downers Grove, IL) with slightly differences [24].

A pancentromeric probe for human alpha satellite DNA was obtained and hybridized as previously described [15]. A mouse pancentromeric probe was also used in this study according to manufacturer's protocol (Cambio, Cambridge, UK).

2.4. Human and mouse SKY

NCEB-1 cell line was additionally examined with the human SKY probe mixture according to the manufacturer's protocol (Applied Spectral Imaging, Migdal Ha-Emck, Israel). Image acquisition was performed on a SKY Vision Cytogenetics Workstation attached to an Olympus BX61 microscope with a 150 W Xenon UV light source. For mouse SKY analysis of the NCEB-1 cell line, the mouse SKY probe mixture from the same manufacturer was used. Images were acquired with an SD300 Spectra cube (Applied Spectral Imaging, Migdal Ha-Emck, Israel) mounted on a Zeiss Axioplan microscope using a custom designed optical filter, SKY-1 (Chroma Technology, Brattleboro, VT).

2.5. Molecular studies

To detect gene copy number alterations of *ATM* and *TP53* genes we performed real-time quantitative PCR (RQ-PCR) with genomic DNA using the ABI Prism 7700 Sequence Detector System (Applied Biosystems, Foster City, CA). The primers and probes used are listed in Table 1. Normalization for the quantity of DNA was done performing simultaneous RQ-PCR for β_2 -microglobulin (β_2M) and albumin (*ALB*) in all cases. Each assay was determined by a comparative C_T (cycle threshold) method, using the arithmetic formula provided by the manufacturer. As controls we used eight DNA samples from peripheral blood and placenta from healthy individuals. The ratios for *ATM* and *TP53* genes relative to β_2M and *ALB* were calculated for each control sample. For each gene, the cut-off ratio was set as the mean ratio of these control samples $\pm 3S.D.$ units. Cut-offs of gain and losses of *TP53* and *ATM* genes were, 1 ± 0.22 and 1 ± 0.24 , respectively. Quantitative PCR for the *INK4a/ARF* locus was performed as previously described [25]. Cut-off was established at 1 ± 0.2 .

Table 1
Primers and Taqman probes used in the RQ-PCR

Locus	Gene	Sequence
4q13.3	<i>ALB</i>	F 5'-AGGGTAAAGAGTCGTCGATATGCT R 5'-CAATCTCAACCCACTGTTCAGCTA 5'-CAAACGCATCCATCTACCAACTTGAGCAT
11q22-q23	<i>ATM</i>	F 5'-AGACCCGCAATCTCATGCA R 5'-GGCCAGGAAAGATGGAGTGA 5'-CTCCAGAGTGGCCCTTG ^a
15q21.1	β_2M	F 5'-GGAATTGATTGGGAGAGCATC R 5'-CAGGTCTGGCTCTACAATTTACTAA 5'-AGTGTGACTGGGCAGATCATCCACCTTC
17p13.1	<i>TP53</i>	F 5'GGG ACC TCT TAT CAA GTG GAA R 5'CCC AAT TGC AGG TAA AAC AGT CA 5' TTT CCA GTC TAA CAC TCA AAA TGC CGT TTT CTT

All probes labeled with FAM.

^a MGB, minor binding groove probe.

TP53 mutational analysis was performed in the five cell lines. Exons 4–9 were amplified by PCR. Single-stranded conformational polymorphism (SSCP) analysis and direct sequencing were performed as previously described [26].

Protein extraction and Western blot analysis was performed as previously described [27]. Antibodies against murine *bcl-2* (Ab-4) (Oncogene Research, Boston, MA, USA) and human *bcl-2* (Clone 124, Dako, Glostrup, Denmark) binding were detected using a chemiluminescence (ECL) detection system (Amersham, Buckinghamshire, UK). Equal protein loading was confirmed with α -tubulin blots.

3. Results

3.1. Cytogenetic characterization of MCL cell lines by M-FISH, aCGH, and mCGH

The genetic alterations of the five MCL cell lines were comprehensively characterized by M-FISH, mCGH and aCGH. The karyotypes were described according to ISCN [28] nomenclature and the results are shown in Table 2 and Fig. 1. Breakpoints derived from M-FISH analysis were strictly revised and matched with the results obtained from the aCGH and mCGH analysis.

The t(11;14)(q13;q32) translocation was detected in the five cell lines including JEKO-1. Previous studies of this cell line had identified a *BCL-1* rearrangement and *CCND1* overexpression but the translocation was not observed in conventional cytogenetic studies [29–31]. In this cell line the t(11;14) translocation also involved chromosome 17q, der(14)t(11;14;17)(q13;q32;q11).

JVM-2 cell line had a diploid karyotype with few secondary chromosomal alterations (Table 2, Fig. 2A). M-FISH analysis identified the three chromosome rearrangements previously observed [32]. However, the array and mCGH allowed an accurate identification of all breakpoints and, in addition, recognized gains at 2p14 and 12q13.13.

GRANTA-519, REC-1, JEKO-1 and NCEB-1 cell lines showed highly complex karyotypes, including 10–20 chromosomal rearrangements. M-FISH analysis of GRANTA-519 (Fig. 2B) revealed a rather uniform pseudodiploid karyotype of $2n = 35-43$, with a modal number of 42 chromosomes in 14 out of 24 metaphases. Three complex translocations were identified involving chromosomes 1, 9, 12, 13, and 14 in der(1)t(1;12;14)(q23.3;p11;q11.2), der(12)t(9;12)(q22.1;p12), der(13)t(1;9;13)(q23.3;p21.1;p11). An unbalanced translocation involving chromosomes 17 and 20 was identified in the majority of cells, and it was associated with the loss of 17p. Furthermore, we identified a hsr at 18q21, as it has been recently published [33]. This hsr was concordant with the metaphase and array CGH results, which showed a clear amplification at 18q21.2–q22.2, in a region flanked by BAC clones RP11-8H2 and RP11-28F1 containing *BCL-2* and *FVT1* genes, respectively (Fig. 2D).

Table 2
Karyotype description and CGH data of the five MCL cell lines

Cell line	mn	Composite karyotype	CGH	
			Gains	Losses
JVM-2	46	46,XX,t(1;15)(q32;q22),der(8)t(3;8)(q13.1;p21.2),t(11;14)(q13;q32)[14]	2p14, 3q13.11–qter, 12q13.13	8p21.2–pter
GRANTA-519	42	35–43<2n>,XX,der(1)t(1;12;14)(p11.1;q23.3;p11;q1.2)del(1)(p11p31.1)[24], del(1)(p35.3)[24],der(3)t(3;18)(p11;q1.2)[21], t(11;14)(q13;q32)[24],der(12)t(9;12)(q22.1;p12)[24], –12[23],der(13)t(1;9;13)(q23.3;p21.1;p11)[23], –14[19], –17[21],der(17)t(17;20)(p11.2;q11.23)[21], –18[22], hsr(18)(q21)[24],der(18)t(10;18)[2], –22[3][cp24]	17q, 18q, 18q21–q22	1p34–pter, 1p11–p31.1, 1q23.3 ^a , 9p21.3–p23, 9q13–q21, 9q22.1 ^a , 9q22.1 ^a , 17p11.2–pter, 18p, 20p, 20q11.23
REC-1	35	28–44<2n>,X,-Y[5], –1[3],del(1)(p21.2;p31.1)[8], –2[4], der(2)t(1;2)(p36.2;q14.1)[7],der(4)t(4;5)(p16;p15.2)[11], –5[3],der(5)t(5;6)(p15.2;q25)[7], –7[5], –8[4], der(8)t(8;11)(p11.2;q13)[8], –9[2],del(9)(p21.2)[8], der(9)t(9;16)(q34;p11)[6],der(9)t(9;17)(q34;q11)[4], del(10)(p12.2)[9], –11[8],del(11)(p11)[3], t(11;14)(q13;q32)[7],der(12)t(8;12)(q11;p11)[10], der(12)t(12;13)(q15;q11)[8], +der(12)t(12;17)(p12.2;q11)[6], –13[9], –15[7], del(15)(q21.2)[6],der(16)t(13;16)(q21;q21)[3], der(16)t(16;22)(q12.1;q12.3)[4], –17[3], der(17)t(11;17)(q11;q11)[9], –18[6], –19[6], –20[4], –21[4]–22[5], –22x2[7][cp12]	1p36.2–pter, 5p15.2 ^b , 8q, 11q13.2–qter, 12q14.1–q21.2, 19p13–pter, 20 ^b	1p21.2–p31.1, 2q14.1–qter, 8p11.21–pter, 9p21.2–pter, 10p12.2–p14, 12p13.2–pter, 13q13–q22 ^b , 13q33–qter ^b , 15q21.2–qter, 16q12.1–qter, 17q21.2–q22.2 ^a , 18q22.1 ^a
JEKO-1	76	69–76<3n>,X,del(X)(p21)[11],+del(X)(p21)(2x)[6], der(X)t(X;11)(q??;q13)[9],der(1)t(1;2)(p11;q11)[9], +der(1)t(1;2)(p11;q11)[9],der(1)t(1;2;21)(21qter → q11::2q37 → 2q11::p11 → pter) [2],del(2)(q11)[11], +del(2)(q11)[7],+4[8],+der(5)t(5;12)(p14;q13.12)[7], del(5)(p11)[2],der(6)t(6;17)(p11;q11)[11], der(6)t(6;8;19)(p11;??;??)(2x)[9], der(7)t(4;7)(q21.2;q21)[11],+der(7)t(4;7)(q21.2;q21)[8], –8(2x)[11],del(9)(p11pter)[11], der(9)t(1;9;12)(p32;p11;??)[8],der(9)t(9;14)(q22;q32)[11], + der(9)t(9;14)(q22;q32)[10], der(10)t(10;11)(p11;q13)[11], +der(10)t(10;11)(p11;q13)[11],d er(11)t(11;14)(q13;q32)[11],+der(11)t(11;14)(q13;q32)[8], del(12)(p11)[5],der(13)t(6;13)(p11;p11)[3], der(13)t(6;13)(p11;p11)(2x)[7], +der(13)t(6;13;13)(p11p21;p11;q11)[8], –14[9], der(14)t(10;11;14)(q13;p11)[10], der(14)t(11;14;17)(q13;q32;q11)[3],der(14)t(14;17)(p11;q11)[6],+15[9],+18[8], –19[7],+20[10],+21[5], der(21)t(21;22)(2x)[6], –22[8][cp11]	1q21.1–qter ^a , 2p14–pter, 4q21.2–qter, 6p21.1, 7cen-q31.1 ^a , 8p22.1–p23.1, 8q24.21, 9q22.33–qter, 10, 11p13–p15.5 ^a , 11q13.1–q21, 12q13.12, 13q12.11–q21.2, 13q34–qter ^a , 14q32–qter, 15q15–qter, 16p13.1–pter, 18q21.1–q22.1 ^a , 19p, 20	1p21.2–p34.1, 2p11.2, 6q12–qter, 7q31.2, 8p21.2–q23.2 ^a , 8q24.22–q24.3, 9p21.3–pter, 11q23.3–qter, 12p12.2–p13.2, 14q12–q23.1, 16p11.2–p12.2, 17p11.2–pter, 19q13.3–qter ^a , Xp21–pter
NCEB-1	87	83–94<4n>,X,-X(2x)[14],del(X)(q13)[15], –1[2], –2[15], –3[14],der(5)t(5;12)(q32;q21.33)(2x)[13], –6[3], +8[3],+8(2x)[8],+8(3x)[3], –9[4], der(9)t(9;13)(q31.2;q14.2)(3x)[13], der(10)t(10;15)(q24.1;q12)(2x)[11],der(11)t(X;11)(q13;q13)[13],der(11)t(X;11)(q13;q13)(2x)[2], –12[11], der(12)t(9;12)(q31.2;p13)(2x)[12], –13[4], der(13)t(12;13)(p13;q14.2)[3], der(13)t(12;13)(p13;q14.2)(2x)[9], –14[4], t(11;14)(q13;q32)(2x)[11], –15(2x)[15], –16[12], –16(2x)[3], –17[14], –18[14],+19[3], –20[12], –21[10], –22[10], –22(2x)[3][cp15]	8p23.2, 8p12, 9q31.2, 12p11.22, 12q21.33, 13q14.2, 17q24	2, 3, 6, 9q22.1 ^a , 10q24.1–qter, 11q23.3–qter, 16, 17p13.1–p13.3 ^a , 17q21.2–q23.2 ^a , 18, 20, 22, Y

mn indicates the modal chromosome number. Chromosome amplifications detected by conventional CGH are pointed out in bold.

^a Chromosomal alterations detected exclusively by aCGH.

^b Chromosomal alterations detected exclusively by mCGH, because of missing BAC clones covering those regions or bad hybridization in some BAC spots.

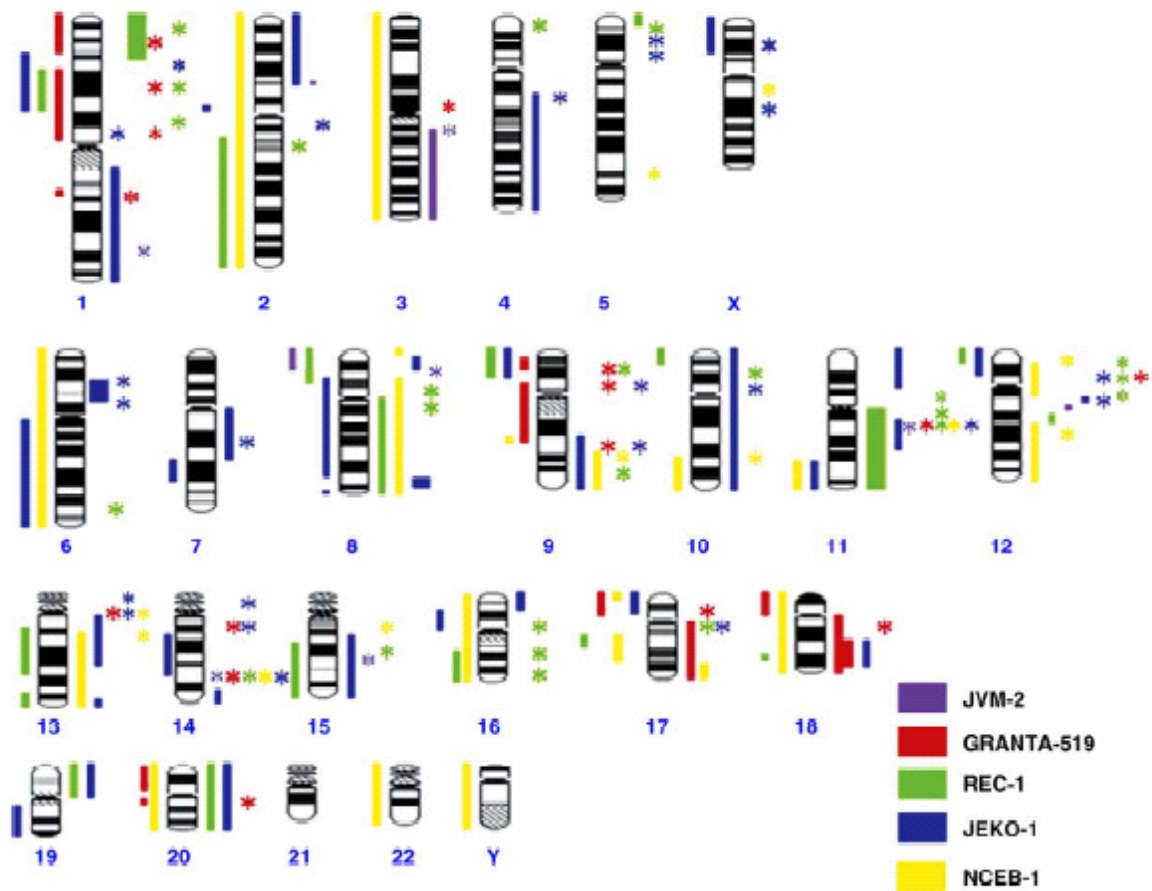


Fig. 1. Ideogram of the distribution of gains and losses of genetic material detected by metaphaseCGH and arrayCGH, and distribution of the breakpoints identified by M-FISH of the five MCL cell lines analyzed (■, GRANTA-519; ■, REC-1; ■, NCEB-1; ■, JEKO-1; ■, JVM-2). Left-sided colored bars correspond to genetic losses whereas right-sided bars indicate genetic gains. Bold bars indicate amplifications. Breakpoints are indicated with an asterisk (*).

REC-1 cell line showed a hypodiploid karyotype with a modal number of 35. Our combined mCGH, aCGH, and M-FISH approach has improved the previous cytogenetic description of this cell line (<http://www.dmsz.de/>). Nineteen chromosomal markers were identified although none of them were present in all metaphases (Fig. 2C). M-FISH detected several chromosome losses in different metaphases not detected by array and mCGH probably because they were heterogeneously distributed among different cells (Table 2). Amplifications at 1p36 and 11q13.2–qter were detected by both mCGH and aCGH. M-FISH showed the loss of an entire chromosome 13 with a fragment of this chromosome translocated to chromosome 12. The mCGH profile showed the loss of a chromosome 13 maintaining a normal cytoband 13q31–q32 profile. These results suggest that the translocated fragment may contain material from bands 13q31–q32 (Fig. 2E). Similar findings including the loss of chromosome 13 maintaining cytoband 13q32 and the presence of selective gains and amplifications of 13q32 have been observed in several MCL, suggesting that this band must contain an important target involved in MCL pathogenesis [7].

JEKO-1 cell line displayed the most complex karyotype, with a modal number of 76 (Fig. 2F). Curiously, the ini-

tial cytogenetic characterization of this cell line showed a pseudodiploid karyotype composed of 40–41 chromosomes [29]. Several alterations observed in the original description of the cell line were also presented in the current study supporting the idea of a clonal evolution. However, most of the structural chromosome markers appeared now duplicated in some metaphases, indicating that tetraploidization may have occurred after an endoreduplication process. Once the cell had endoreduplicated, aneuploidy events lead to numerical alterations affecting both normal and marker chromosomes. Furthermore, chromosome rearrangements involved not only normal chromosomes, but also chromosome markers, which appeared as re-arranged markers. Almost all the chromosomes were affected by some structural or numerical alteration, especially chromosomes 1, 6, 9, 10, 13 and 14. Amplifications at 6p21 detected by BAC RP11-54O15 and at 8q24.21 bordered by BAC clones RP11-2812 and RP11-44ON18 region that includes *C-MYC* gene were detected by metaphase and array CGH.

NCEB-1 cell line showed a near-tetraploid karyotype with a modal number of 87 chromosomes (Fig. 3A). Chromosome 8 was the most represented in the karyotype, with eight copies. All the structural chromosome markers, except

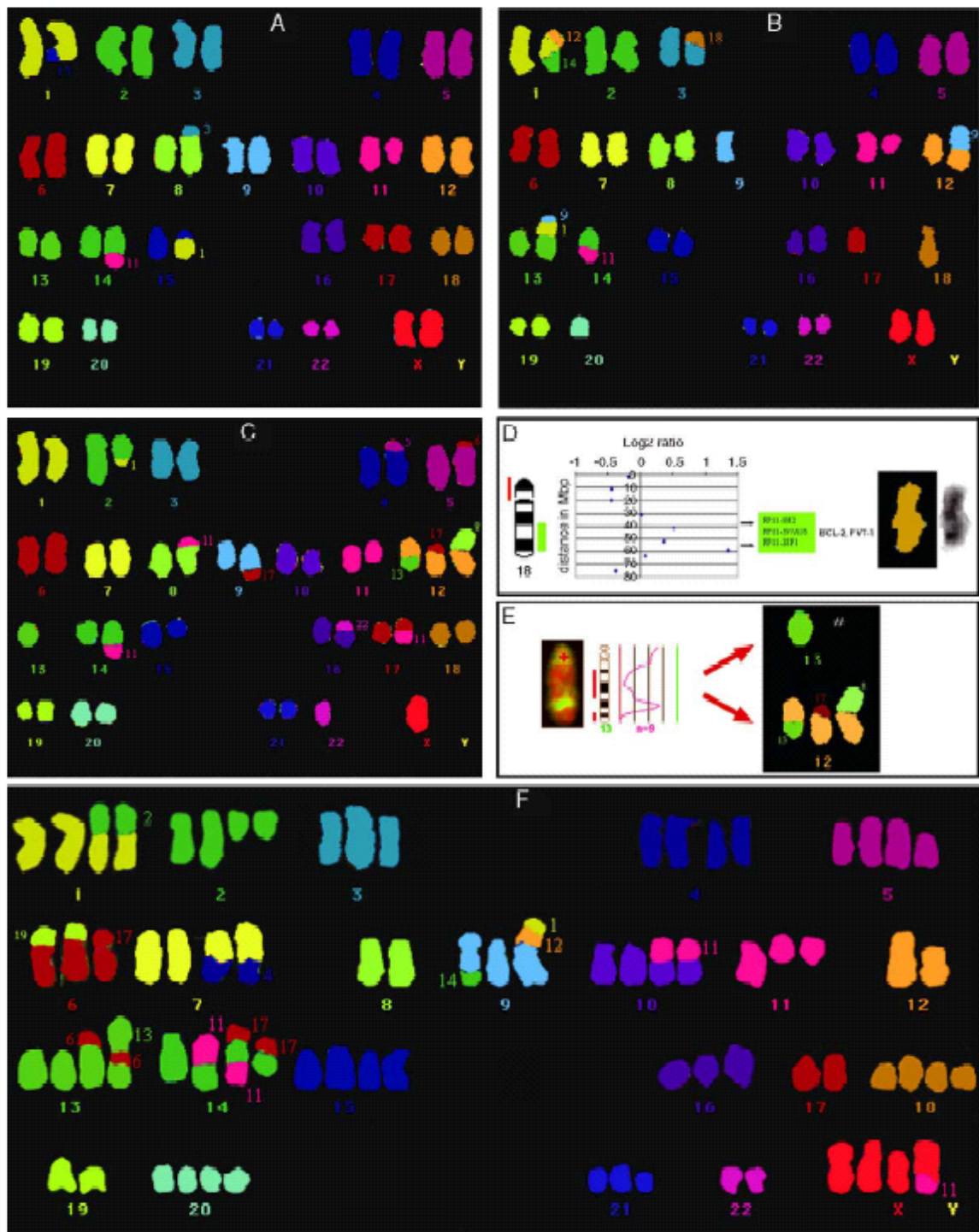


Fig. 2. (A–C) Pseudocolored karyotypes obtained by M-FISH of the cell lines JVM-2, GRANTA-519, and REC-1. (D) Amplification of chromosome 18q21.1–q21.33 in MCL cell line GRANTA-519. This amplification containing *BCL-2* and *FVT-1* is bordered by BAC clones RP11-8H2 and RP11-28F1. (E) Example of the extra information that the integration of mCGH and M-FISH techniques provides: REC-1 cell line shows loss of one chromosome 13 and an amplification of 13q31–q32 region located in the derivative chromosome 12 as M-FISH results show. (F) Karyotype of the JEKO-1 cell line.

del(X)(q13), appeared in duplicate or even in triplicate in some metaphases. This observation suggests that almost all the structural abnormalities were acquired before an endoreduplication process that may have caused the polyploidization.

3.2. *NCEB-1* cell line contains several mouse chromosomes

Interestingly, *NCEB-1* contained 5–8 fixed unidentified acrocentric chromosomal markers by M-FISH (Fig. 3B). In

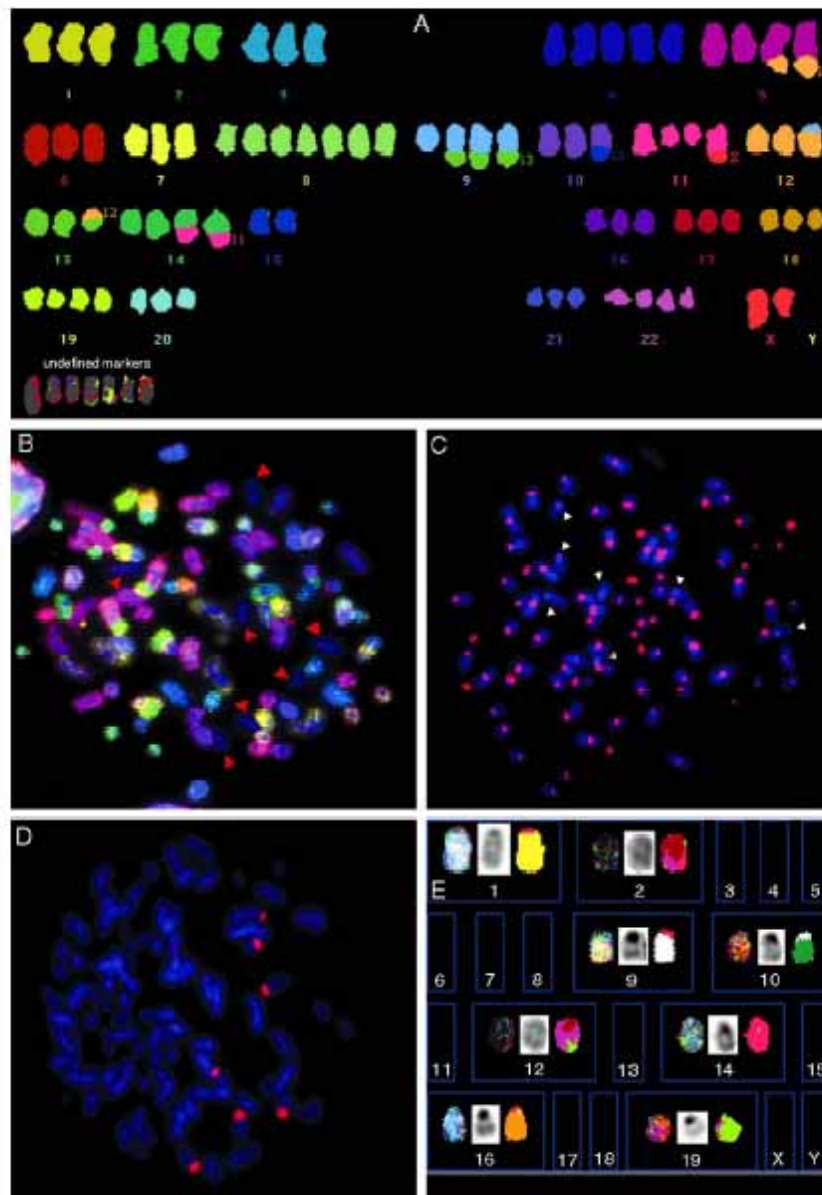


Fig. 3. (A) Pseudocolored karyotype of the NCEB-1 cell line. (B) A representative illustration of a NCEB-1 metaphase after hybridization. Note that the chromosomes pointed with a red arrowhead are only stained with DAPI and did not hybridize with any fluorochrome of the M-FISH probe mixture. (C) A representative metaphase of NCEB-1 after hybridization with a human pancentromeric probe. White arrowheads are showing chromosomes without human centromere signal. (D) Metaphase of NCEB-1 with prominent mouse centromere signals in seven chromosomes after performing FISH with mouse pancentromeric probe. (E) Mouse SKY approach allowed us to identify the mouse chromosomes residing in the human MCL NCEB-1 cell line.

addition, these chromosomal markers were not identified by a human SKY analysis and failed to be recognized by a human pancentromeric probe (Fig. 3C). The lack of identification with several human probes, the characteristic features of the centromeres and morphology of these markers suggested that they might correspond to mouse chromosomes. To confirm this idea, we hybridized the metaphases with a mouse-specific α -DNA probe that gave a positive signal in all those chromosome markers (Fig. 3D). A mouse SKY analysis identified these markers as chromosomes 1, 2, 9, 10, 12, 14, 16 and 19 (Fig. 3E). They were apparently not rearranged

with human chromosomes and they were present in all the metaphases.

Although we initially observed these murine chromosomes in the cell line received from Denmark, we confirmed the presence of the same murine chromosomes in a new strain of NCEB-1 from the laboratory of Pathology, NCI, Bethesda, USA.

To determine whether murine genes could be expressed in this cell line we examined the presence of murine bcl-2 protein. This gene is located at murine chromosome 1, present in the cell line. A Western blot analysis showed that NCEB-1

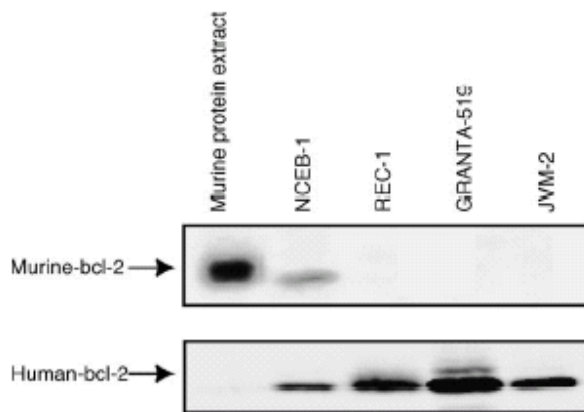


Fig. 4. Western blot analysis of murine and human bcl-2 expression in four cell lines. Murine-bcl-2 expression was only detected in the human NCEB-1 cell line.

expressed both human and murine bcl-2, indicating that genes present in murine chromosomes are expressed in NCEB-1 (Fig. 4).

3.3. Minimal common altered regions

After combining M-FISH and CGH data, we defined minimal common regions of losses and gains, and frequent chromosome breakpoints in MCL cell lines (Fig. 1). Recurrent copy number changes were defined in this study as the minimal common regions of gains and losses in at least two cell lines. Thus, common gained regions were 2p14, 9q31.2–qter, 11q13.1–q21, 13q14–q21.2, 13q34–qter and 18q21.1–q22.1, and common losses were located at 1p21.2–p31.1, 2p11.2, 8p21.2–pter, 9p21.3–pter, 11q23.3qter, 17p11.2–pter, and 17q21.2–q22.2. Although there was a repeated gain at 12q13–q14 in several cell lines there was not a common region between them. Common breakpoints in at least two cell lines detected by M-FISH were located at 1p31.1, 9p21, 9q22, 11q13, 12p11–p12, 14q32, 15q21–q22 and 17q11.

Table 3
Cytogenetic variability and genomic alterations in mantle-cell lymphoma cell lines

Cell line	Cytogenetic alterations			Molecular alterations					
	mn/Ploidy	mn variability ^a (%)	Non-clonal structural variability ^b	<i>TP53</i> gene		<i>INK4a/ARF</i> locus		<i>ATM</i> gene	
				aCGH	Gene status	aCGH	Gene status	aCGH	Gene status
JVM-2	46/2n	–	–	wt	wt	wt	wt	wt	wt
GRANTA-519	42/2n–	41.6	0.25	del(17)(p11.2–pter)	del/wt	del(9)(p21.1–p23)	Hom del	wt	wt ^c
REC-1	35/2n–	66.6	0.83	wt	wt	del(9)(p21.3–pter)	Hom del	dup(11)(q13.2–qter)	Amp
JEKO-1	76/3n+	54.5	0.45	del(17)(p11.2–pter)	del/mut(D58–59)	del(9)(p21.3–pter)	Het del	dup(11)(q13.2–qter)	Amp
NCEB-1	87/4n–	73.3	0.27	del(17)(p13.1–p13.3)	del/mut(220G → A)	wt	wt	del(11)(q23.3–qter)	Del

mn: modal number; wt: wild-type; del: deletions, mut: mutated; Hom del: homozygous deletions; Het del: heterozygous deletions; Amp: amplified; Del: deleted.

^a Percentage of metaphases in which the chromosomes number is different from the modal number.

^b Number of non-clonal structural rearrangements per cell.

^c GRANTA-519 carries the *ATM* gene mutation 8494C → T. [50].

3.4. Karyotype plasticity

The different MCL cell lines showed a heterogeneous degree of karyotype variability among the metaphases examined. Regarding numerical alterations, a stable modal chromosome number was observed in JVM-2, whereas GRANTA-519, REC-1, JEKO-1, and NCEB-1 displayed a large number of metaphases with different number of chromosomes from the modal number (Table 3). Besides, JEKO-1 and NCEB-1 displayed a near-triploid and near-tetraploid karyotype, respectively, suggesting that aneuploidy is a common event in these cell lines. These cell lines also showed marked differences in structural alterations. Inter-cellular variability in chromosome structure was assessed by counting the number of non-clonal structural rearrangements divided by the number of metaphases examined [34]. JVM-2 showed the most stable karyotype with absence of non-clonal structural aberrations. GRANTA-519, JEKO-1, and NCEB-1 displayed several chromosome markers but almost all of them appeared clonally in all the metaphases. The number of non-clonal aberrations was six in 24 (25%) metaphases in GRANTA-519, 4 in 15 (27%) metaphases in NCEB-1, and 5 in 11 (45%) metaphases in JEKO-1, indicating a low or moderate level of ongoing structural instability. On the contrary, REC-1 showed a high number of non-clonal aberrations with 10 in 12 (83%) metaphases, suggesting a high level of ongoing structural instability.

3.5. Molecular analysis

A molecular analysis of *TP53*, *ATM* and *INK4a/ARF* loci was performed in these cell lines (Table 3). Although previous studies have not detected *TP53* mutations in JEKO-1 [30], sequencing of *TP53* gene in this cell line revealed one bp deletion in exon 4, codon 58 and 59, producing a stop codon at 122–123 (Fig. 5). Similarly, we recognized a mutation in the *TP53* gene in NCEB-1 cell line harboring

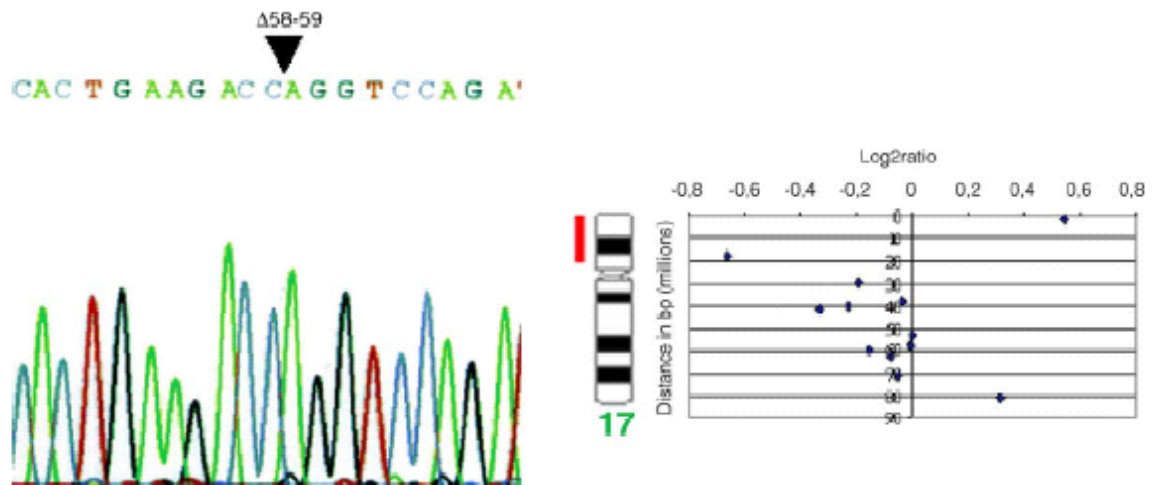


Fig. 5. (A) *TP53* exon 4 sequencing analysis of JEKO-1 showing a 1 bp deletion between codons 58–59, resulting in a stop codon in positions 122–123. (B) Illustration of the loss at 17p detected by mCGH and aCGH in JEKO-1 cell line.

a G-to-A substitution at nucleotide 220 in exon 6. A concordant 17p13.1–13.3 deletion was observed in these two cell lines by aCGH. GRANTA-519 showed a 17p11.1–pter loss detected by mCGH and aCGH that was previously confirmed by FISH analysis with a specific *TP53* probe [35] and quantitative PCR of the *TP53* gene, suggesting that the 17p loss included a *TP53* allele. However, sequencing analysis of exons 4–9 of *TP53* gene did not reveal any nucleotide change. No alterations were observed in the other cell lines. Homozygous deletions of the *INK4a/ARF* locus were detected in GRANTA-519 and REC-1 whereas only a hemizygous loss was observed in JEKO-1. JVM-2 and NCEB-1 showed a normal *INK4a/ARF* gene dose. Concordantly with the cytogenetic observation of the 11q22 region, REC-1 and JEKO-1 showed an amplification of *ATM* gene, whereas NCEB-1 showed an allelic deletion (Table 3).

4. Discussion

In this study we have characterized cytogenetically five MCL cell lines by M-FISH, mCGH, and aCGH. Genetic gains and losses detected by metaphase and array CGH improved the resolving power of M-FISH providing a detailed description of the chromosome markers of these cell lines. In the study we have identified new chromosomal alterations and determined the origin of previously unidentified rearrangements, and the location of the breakpoints of most of them. Thus, we have identified new breakpoints located at 1p31.1, 9q22, 13q13, 15q21–q22, 17q11 and 17q21.2 by combining the three techniques. New breakpoints only detected by M-FISH, but not by aCGH, were located at 1q32, 4p16, 5p11, 5p14, 6q25, 9p23, 9q34, 10p11 and Xq22, as a result of balanced translocations. In addition, the majority of aCGH discontinuities were confirmed by M-FISH except 8q23.2, 8q24.22, 8q24.3, 11p13, 11p15.5, 11q21, 11q23.3, 12p12, 12q12, 13q13.3, 13q22, 13q33, 17q21.2,

17q22, 17q23.2, 18q22.1, probably generated by interstitial duplications and deletions not detectable by M-FISH.

In addition to the findings in previous aCGH studies [36–38], we have identified new minimal common regions of gain at 13q34–qter, and loss at 11q23.3–qter and 17q21.2–q22.2. Moreover, we confirm the previously described high-level amplification at 18q21 in GRANTA-519 [33]. By means of aCGH, we bordered the amplified region at 18q21.1–q21.33 that contains *BCL-2* and *FVT1*.

The chromosomal imbalances observed in these cell lines are relatively concordant with the aberrations observed in primary MCL [5–8,13,37,38]. Only gains at 2p14, 13q14–q21.2 and 13q14.34, and losses at and 17q21.2–q22.2 were restricted to these cell lines and not detected in previous MCL CGH analysis. Partial deletion of 1p, 6q, 9p, and 17p, and breakpoints at 1p21–p22, 1p31–p32, 1q21, 6q11–q15, 6q23–q25, 8q24, 9p21–p24, 11q13–q23, 13q12–q14, and 17p12–p13 found in these five cell lines were in agreement with previous cytogenetic studies [39].

Our current study defines subsets of in vitro patterns of karyotypic variability in mantle-cell lymphoma cell lines according to chromosomal rearrangements, similarly to what has been described in several types of solid tumors [40]. Firstly, JVM-2 had a stable karyotype. Secondly, GRANTA-519, NCEB-1 and JEKO-1 cell lines were numerically heterogeneous, but did not display a significant ongoing level of structural abnormalities. GRANTA-519 displayed numerical heterogeneity with the prevalence of a single clone population. NCEB-1 presented a near-tetraploid karyotype, with an evidence of genetic selection for some aneuploidies affecting chromosomal markers and whole chromosomes, e.g., der(9)t(9;13) and chromosome 8, respectively. JEKO-1 showed a near-triploid karyotype, exhibited substantially more structural changes, specially affecting chromosomes 1, 6, 9, 10, 13 and 14, and the percentage of non-clonal structural rearrangements was slightly higher than NCEB-1. Duplicated chromosome markers indicate that this cell line

also became tetraploid beforehand, but numerical instability led to evolve to a pseudotriploid karyotype. Finally, REC-1 showed an unstable karyotype, with a high degree of numerical and structural variability between metaphases, consistent with ongoing chromosome instability. REC-1 appeared with a high incidence of aneuploidy as a pseudodiploid karyotype. The apparently large number of non-clonal alterations is the reason to consider the high degree of structural chromosome heterogeneity in this cell line. As it has been previously postulated, genetic heterogeneity is a feature of cancer cells that most likely eases its adaptability [14,41]. Further studies in MCL patients should clarify whether these patterns of chromosome instability are also present in primary tumors.

Cancer cells may become tetraploid in different ways, including mitotic arrest, failed cytokinesis, spindle defects and endoreduplication. Endoreduplicated metaphases are those in which one can see four chromatids in each chromosome. Despite this rare event, we considered that metaphase spreads showing all or most of the chromosomal markers duplicated and did not show a high level of ongoing aneuploidies, could be previously involved in an endoreduplication cycle. According to this definition, NCEB-1 cell line might be a good candidate to fit with this description. Similarly, JEKO-1 displayed a near-triploid karyotype, but it may also come up from a previous tetraploidization, because several chromosomal markers are duplicated, even in three or four copies.

Molecular studies in MCL have demonstrated frequent inactivation of *INK4a/ARF* and *TP53*, particularly in aggressive blastoid variants [42–45]. *TP53* mutations are mainly detected in tumors with wild-type *INK4a/ARF* [26,46]. The study of these genes in the MCL cell lines showed also a similar alternative pattern of alterations since we detected *TP53* mutations in JEKO-1 and NCEB-1 with wild-type *INK4a/ARF*, whereas GRANTA-519 and REC-1 had homozygous deletions of *INK4a/ARF* locus with wild-type *TP53*. Interestingly, *TP53* mutations were observed in the two cell lines with polyploid karyotypes suggesting that inactivation of this gene may facilitate the development of this phenotype. *TP53* mutations are usually associated with deletions of the other allele. GRANTA-519 had a heterozygous deletion of *TP53* confirmed by FISH and quantitative PCR but no mutations were detected in exons 4–9.

The finding of mouse chromosomes in the NCEB-1 cell line was unexpected. The source of these chromosomes is not clear. The fact that we detected them in two different stains from different laboratories apparently not interconnected and they have been also observed in a third laboratory (Dr. F. Bertoni, Bellinzona, Switzerland, pers. commun.) suggest that this contamination may have occurred early in the generation of the cell line. Interestingly, this cell line was originally seeded on mouse peritoneal macrophages that may have generated occasional cell fusions and subsequent stabilization of mouse chromosomes into human cells [47]. Intra and interspecies cross-contaminations in human cell lines have been

extensively reported [48,49]. However, we are not aware of a previous observation of stable murine chromosomes fused in a human cell line. In addition, we have also demonstrated that murine genes might be expressed in the NCEB-1 human cells. NCEB-1 cell line has been previously used in several studies as an *in vitro* model for the study of MCL, but unfortunately, none of them performed a thorough cytogenetic analysis. The possible influence of expressed murine genes should be evaluated carefully in biological experiments using this cell line.

Acknowledgements

We thank Àngels Niubó, Laura Pla, Candida Gómez, and Amparo Arias for their excellent technical assistance. This work was supported by Spanish Ministry of Education and Science (CICYT SAF05/5855), European Union Contract LSHC-CT-2004-503351, Lymphoma Research Foundation, FIS 01/3046, Instituto de Salud Carlos III, Redes Temáticas C03/10 (Centros de Cancer), G03/179 (Red de Linfomas), C03/05 (INERGEN), and Cancer Research UK (CRUK), Wellbeing and the Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC). JC is a fellow of the Universitat Autònoma de Barcelona, and belongs to the research program EPICUR-Red. IS is a fellow of the Universitat de Barcelona supported by the Grant (60BA200406008, Distinció per a la Promoció a la Recerca de la Generalitat de Catalunya).

Contributions. Jordi Camps and Itziar Salaverria did the experimental work including CGH, FISH and molecular analysis, and manuscript preparation. Maria J. Garcia and Jessica C. Pole carried out the array-CGH experiments. Esther Prat, Javier Del Rey and Marta Bernués performed CGH, FISH and human SKY analysis. Sílvia Beà was involved in CGH analysis and manuscript preparation. Lluís Hernández was involved in cell culturing. Juan C. Cigudosa contributed to Mouse-SKY analysis. Carlos Caldas did the array-CGH supervision. Dolors Colomer involved in molecular analysis. Rosa Miró and Elías Campo contributed to study design and supervision and manuscript preparation.

References

- [1] Bosch F, Jares P, Campo E, Lopez-Guillemo A, Piris MA, Villamor N, et al. PRAD-1/cyclin D1 gene overexpression in chronic lymphoproliferative disorders: a highly specific marker of mantle cell lymphoma. *Blood* 1994;84:2726–32.
- [2] Vaandrager JW, Schuuring E, Zwikstra E, de Boer CJ, Kleiverda KK, van Krieken JH, et al. Direct visualization of dispersed 11q13 chromosomal translocations in mantle cell lymphoma by multicolor DNA fiber fluorescence *in situ* hybridization. *Blood* 1996;88:1177–82.
- [3] Hinds PW, Dowdy SF, Eaton EN, Arnold A, Weinberg RA. Function of a human cyclin gene as an oncogene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:709–13.
- [4] Cuneo A, Bigoni R, Rigolin GM, Roberti MG, Bardi A, Piva N, et al. Cytogenetic profile of lymphoma of follicle mantle lineage: correlation with clinicobiologic features. *Blood* 1999;93:1372–80.

- [5] Wlodarska I, Pittaluga S, Hagemeijer A, De Wolf-Peeters C, Van Den Berghe H. Secondary chromosome changes in mantle cell lymphoma. *Haematologica* 1999;84:594–9.
- [6] Monni O, Oinonen R, Elonen E, Franssila K, Teerenhovi L, Joensuu H, et al. Gain of 3q and deletion of 11q22 are frequent aberrations in mantle cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1998;21:298–307.
- [7] Bea S, Ribas M, Hernandez JM, Bosch F, Pinyol M, Hernandez L, et al. Increased number of chromosomal imbalances and high-level DNA amplifications in mantle cell lymphoma are associated with blastoid variants. *Blood* 1999;93:4365–74.
- [8] Bentz M, Plesch A, Bullinger L, Stilgenbauer S, Ott G, Muller-Hermelink HK, et al. t(11;14)-positive mantle cell lymphomas exhibit complex karyotypes and share similarities with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2000;27:285–94.
- [9] Martínez-Climent JA, Vizcarra E, Sanchez D, Blesa D, Manuán I, Benet I, et al. Loss of a novel tumor suppressor gene locus at chromosome 8p is associated with leukemic mantle cell lymphoma. *Blood* 2001;98:3479–82.
- [10] Allen JE, Hough RE, Goepel JR, Bottomley S, Wilson GA, Alcock HE, et al. Identification of novel regions of amplification and deletion within mantle cell lymphoma DNA by comparative genomic hybridization. *Br J Haematol* 2002;116:291–8.
- [11] Tagawa H, Tsuzuki S, Suzuki R, Kaman S, Ota A, Kameoka Y, et al. Genome-wide array-based comparative genomic hybridization of diffuse large B-cell lymphoma: comparison between CD5-positive and CD5-negative cases. *Cancer Res* 2004;64:5948–55.
- [12] Schraders M, Pfundt R, Straatman HM, Janssen IM, van Kessel AG, Schoenmakers EF, et al. Novel chromosomal imbalances in mantle cell lymphoma detected by genome-wide array-based comparative genomic hybridization. *Blood* 2005;105:1686–93.
- [13] Kohlhammer H, Schwaenen C, Wessendorf S, Holzmann K, Kestler HA, Kienle D, et al. Genomic DNA-chip hybridization in t(11;14)-positive mantle cell lymphomas shows a high frequency of aberrations and allows a refined characterization of consensus regions. *Blood* 2004;104:795–801.
- [14] Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998;396:643–9.
- [15] Camps J, Ponsa I, Ribas M, Prat E, Egozcue J, Peinado MA, et al. Comprehensive measurement of chromosomal instability in cancer cells: combination of fluorescence in situ hybridization and cytokinesis-block micronucleus assay. *FASEB J* 2005;19:828–30.
- [16] Orchard J, Garand R, Davis Z, Babbage G, Sahota S, Matutes E, et al. A subset of t(11;14) lymphoma with mantle cell features displays mutated IgVH genes and includes patients with good prognosis, nonnodal disease. *Blood* 2003;101:4975–81.
- [17] Ruchlemer R, Parry-Jones N, Brito-Babapulle V, Attolico I, Wotherpoon AC, Matutes E, et al. B-prolymphocytic leukaemia with t(11;14) revisited: a splenomegalic form of mantle cell lymphoma evolving with leukaemia. *Br J Haematol* 2004;125:330–6.
- [18] Smith MD, Singleton TP, Balaraman S, Jaiyesini I, O'Malley B, Al-Saadi A, et al. Case report: mantle cell lymphoma, prolymphocytoid variant, with leukostasis syndrome. *Mod Pathol* 2004;17:879–83.
- [19] Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992;258:818–21.
- [20] Prat E, Bernues M, Caballin MR, Egozcue J, Gelabert A, Miro R. Detection of chromosomal imbalances in papillary bladder tumors by comparative genomic hybridization. *Urology* 2001;57:986–92.
- [21] Huang HE, Chin SF, Ginestier C, Bardou VJ, Adelaide J, Iyer NG, et al. A recurrent chromosome breakpoint in breast cancer at the NRG1/neuregulin 1/hergulin gene. *Cancer Res* 2004;64:6840–4.
- [22] Fiegler H, Carr P, Douglas EJ, Burford DC, Hunt S, Scott CE, et al. DNA microarrays for comparative genomic hybridization based on DOP-PCR amplification of BAC and PAC clones. *Genes Chromosomes Cancer* 2003;36:361–74.
- [23] Speicher MR, Gwyn Ballard S, Ward DC. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* 1996;12:368–75.
- [24] Gutierrez NC, Camps J, Hernandez JM, Garcia JL, Prat E, Gonzalez MB, et al. Multicolor fluorescence in situ hybridization studies in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Hematol J* 2003;4:67–70.
- [25] Hernandez-Boluda JC, Cervantes F, Colomer D, Vela MC, Costa D, Paz MF, et al. Genomic p16 abnormalities in the progression of chronic myeloid leukemia into blast crisis: a sequential study in 42 patients. *Exp Hematol* 2003;31:204–10.
- [26] Pinyol M, Hernandez L, Martínez A, Cobo F, Hernandez S, Bea S, et al. INK4a/ARF locus alterations in human non-Hodgkin's lymphomas mainly occur in tumors with wild-type p53 gene. *Am J Pathol* 2000;156:1987–96.
- [27] Bellosillo B, Villamor N, Lopez-Guillermo A, Marce S, Bosch F, Campo E, et al. Spontaneous and drug-induced apoptosis is mediated by conformational changes of Bax and Bak in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;100:1810–6.
- [28] Mitelman F. ISCN: an international system for human cytogenetic nomenclature. Basel; 1995.
- [29] Jeon HJ, Kim CW, Yoshino T, Akagi T. Establishment and characterization of a mantle cell lymphoma cell line. *Br J Haematol* 1998;102:1323–6.
- [30] Amin HM, McDonnell TJ, Medeiros LJ, Rassidakis GZ, Leventaki V, O'Connor SL, et al. Characterization of 4 mantle cell lymphoma cell lines. *Arch Pathol Lab Med* 2003;127:424–31.
- [31] Drexler HG, MacLeod RAF. Malignant hematopoietic cell lines: in vitro models for the study of mantle cell lymphoma. *Leuk Res* 2002;26:781–7.
- [32] Tanke HJ, De Haas RR, Sagner G, Ganser M, van Gijlswijk RP. Use of platinum coproporphyrin and delayed luminescence imaging to extend the number of targets FISH karyotyping. *Cytometry* 1998;33:453–9.
- [33] Rudolph C, Steinemann D, von Neuhoff N, Gadzicki D, Ripperger T, Drexler HG, et al. Molecular cytogenetic characterization of the mantle cell lymphoma cell line GRANTA-519. *Cancer Genet Cytogenet* 2004;153:144–50.
- [34] Camps J, Morales C, Prat E, Ribas M, Capella G, Egozcue J, et al. Genetic evolution in colon cancer KM12 cells and metastatic derivatives. *Int J Cancer* 2004;110:869–74.
- [35] Ferrer A, Marce S, Bellosillo B, Villamor N, Bosch F, Lopez-Guillermo A, et al. Activation of mitochondrial apoptotic pathway in mantle cell lymphoma: high sensitivity to mitoxantrone in cases with functional DNA-damage response genes. *Oncogene* 2004;23:8941–9.
- [36] de Leeuw RJ, Davies JJ, Rosenwald A, Bebb G, Gascoyne RD, Dyer MJ, et al. Comprehensive whole genome array CGH profiling of mantle cell lymphoma model genomes. *Hum Mol Genet* 2004;13:1827–37.
- [37] Tagawa H, Karnan S, Suzuki R, Matsuo K, Zhang X, Ota A, et al. Genome-wide array-based CGH for mantle cell lymphoma: identification of homozygous deletions of the proapoptotic gene BIM. *Oncogene* 2005;24:1348–58.
- [38] Rubio-Moscardo F, Climent J, Siebert R, Piris MA, Martín-Subero JI, Nielandar I, et al. Mantle-cell lymphoma genotypes identified with CGH to BAC microarrays define a leukemic subgroup of disease and predict patient outcome. *Blood* 2005;105:4445–54.
- [39] Au WY, Gascoyne RD, Viswanatha DS, Connors JM, Klasa RJ, Horsman DE. Cytogenetic analysis in mantle cell lymphoma: a review of 214 cases. *Leuk Lymphoma* 2002;43:783–91.
- [40] Albertson DG, Collins C, McCormick F, Gray JW. Chromosome aberrations in solid tumors. *Nat Genet* 2003;34:369–76.
- [41] Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976;194:23–8.
- [42] Greiner TC, Moynihan MJ, Chan WC, Lytle DM, Pedersen A, Anderson JR, et al. p53 mutations in mantle cell lymphoma are

- associated with variant cytology and predict a poor prognosis. *Blood* 1996;87:4302–10.
- [43] Hernandez L, Fest T, Cazorla M, Tenuya-Feldstein J, Bosch F, Peinado MA, et al. p53 gene mutations and protein overexpression are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas. *Blood* 1996;87:3351–9.
- [44] Dreyling MH, Bullinger L, Ott G, Stilgenbauer S, Muller-Hermelink HK, Bentz M, et al. Alterations of the cyclin D1/p16-pRB pathway in mantle cell lymphoma. *Cancer Res* 1997;57:4608–14.
- [45] Pinyol M, Hernandez L, Cazorla M, Balbin M, Jares P, Fernandez PL, et al. Deletions and loss of expression of p16INK4a and p21Waf1 genes are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas. *Blood* 1997;89:272–80.
- [46] Gronback K, de Nully Brown P, Moller MB, Nedergaard T, Ralfkiaer E, Moller P, et al. Concurrent disruption of p16INK4a and the ARF-p53 pathway predicts poor prognosis in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia* 2000;14:1727–35.
- [47] Saltman DL, Cachia PG, Dewar AE, Ross FM, Krajewski AS, Ludlam C, et al. Characterization of a new non-Hodgkin's lymphoma cell line (NCEB-1) with a chromosomal (11:14) translocation [t(11:14)(q13;q32)]. *Blood* 1988;72:2026–30.
- [48] MacLeod RAF, Dirks WG, Matsuo Y, Kaufmann M, Milch H, Drexler HG. Widespread intraspecies cross-contamination of human tumor cell lines arising at source. *Int J Cancer* 1999;83:555–63.
- [49] Markovic O, Markovic N. Cell cross-contamination in cell cultures: the silent and neglected danger. *In Vitro Cell Dev Biol: Anim* 1998;34:1–8.
- [50] Vorechovsky I, Luo L, Dyer MJ, Catovsky D, Amlot PL, Yaxley JC, et al. Clustering of missense mutations in the ataxia-telangiectasia gene in a sporadic T-cell leukaemia. *Nat Genet* 1997;17:96–9.

TREBALL N°2

Les alteracions secundàries específiques en Limfoma de Cèl·lules del Mantell proporcionen informació pronòstica independent de la signatura de proliferació calculada a partir de l'expressió.

(Journal of Clinical Oncology 25:1216-1222, 2007)

Les alteracions secundàries específiques en Limfoma de Cèl·lules del Mantell proporcionen informació pronòstica independent de la signatura de proliferació calculada a partir de l'expressió

Utilitzant Hibridació genòmica comparada (CGH) hem investigat les alteracions genètiques de 71 pacients amb MCL CCND1-positius i 6 pacients de Limfoma de cèl·lules del mantell CCND1-negatius prèviament caracteritzats mitjançant el seu perfil d'expressió. Les alteracions més freqüents en MCL sense expressió de CCND1 foren els guanys de 3q, 8q i 15q, i les pèrdues de 1p, 8p23-pter, 9p21-pter, 11q21-q23 i 13q, que també van ser les alteracions més freqüents en els MCL convencionals, donant pes a la idea de que aquests dos tipus de MCL pertanyen a la mateixa entitat biològica.

L'estudi paral·lel dels resultats de CGH i de les dades d'expressió va demostrar que les alteracions cromosòmiques tenen un impacte significatiu en l'expressió dels gens localitzats en les regions alterades, sent alguns d'aquests gens relacionats amb proliferació i reparació de dany de DNA.

L'anàlisi de factors pronòstic va mostrar que la signatura de proliferació, el nombre d'alteracions cromosòmiques, els guanys de 3q, les pèrdues de 8p, 9p i 9q tenien un valor predictiu en la supervivència dels pacients. Un anàlisi multivariat va mostrar que la proliferació és el predictor més fort de curta supervivència però que els guanys de 3q i les pèrdues de 9q proporcionen una informació pronòstica que és independent de proliferació, augmentant el seu valor predictiu.

En conclusió els MCL CCND1-positius i els CCND1-negatius comparteixen les mateixes alteracions secundàries donant suport a la idea que corresponen a la mateixa entitat biològica. La integració de la signatura de proliferació i la informació genètica de les regions 3q i 9q augmenta la habilitat de predir la supervivència en els pacients amb MCL.

From the Department of Pathology and Hematology, Hospital Clinic, University of Barcelona, Cancer Epidemiology Service, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge, Catala Institute of Oncology and Laboratori d'Estadística i Epidemiologia, Autonomous University of Barcelona, Department of Statistics, E.T.S.E.I.B. Polytechnic University of Barcelona, Barcelona, Spain; Department of Pathology, University of Würzburg, Würzburg, Germany; Biometric Research, Metabolism and Pathology Branch, National Cancer Institute, and Biostatistics and Molecular Analysis Section, Computational Biomedicine and Engineering Laboratory, Center for Information Technology, National Institutes of Health, Bethesda, MD; Departments of Pathology and Microbiology, and Internal Medicine, University of Nebraska Medical Center, Omaha, NE; Department of Pathology, Netherlands Cancer Center, Amsterdam, the Netherlands; Department of Pathology and Division of Medical Oncology, University of British Columbia and British Columbia Cancer Agency, Vancouver, British Columbia, Canada; Southwest Oncology Group, Oregon Health and Science University, Portland, OR; Departments of Pathology and Medicine, University of Arizona Cancer Center, Tucson, AZ; James P. Wilmot Cancer Center, University of Rochester School of Medicine, Rochester, NY; and Departments of Immunology, Oncology, and Pathology, Fikshospitalet-Radiumhospitalet, Medical Center and University of Oslo, Oslo, Norway.

Submitted August 4, 2006; accepted December 28, 2006; published online ahead of print at www.jco.org on February 12, 2007.

Supported by the Spanish Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) Grant No. SAF05/9856, Instituto de Salud Carlos III, Plan Terapéutica de Cáncer (Grant No. G03/10), Plan Terapéutica Infomas (Grant No. G03/179), to E.C.; the European Union Contract No. LSHC-CT 2004-002281, the Interdisciplinary Center for Clinical Research of the University of Würzburg, Germany (to A.R.); The Lymphoma Research Foundation, and by a Director's Challenge grant (Grant No. LD1-CAB4807) from the National Cancer Institute, Bethesda, MD (to W.C.C.).

Presented as oral communication at the 2006 United States and Canada Academy of Pathology Annual Meeting, February 11-17, 2006, Atlanta, GA.

IS, A.Z., and S.B. contributed equally to this work. A.R. and E.C. are the co-senior authors of this work.

Authors' disclosures of potential conflicts of interest and author contributions are found at the end of this article.

Address reprint requests to Elias Campo, MD, Hematopathology Section, Hospital Clinic, Viladot 170, 08035-Barcelona, Barcelona, Spain; e-mail: acampo@clinic.ub.es.

© 2007 by American Society of Clinical Oncology

0732-183X/07/2510-1216/\$20.00

DOI: 10.1200/JCO.2006.08.4251

Specific Secondary Genetic Alterations in Mantle Cell Lymphoma Provide Prognostic Information Independent of the Gene Expression–Based Proliferation Signature

Itziar Salaverria, Andreas Zettl, Silvia Beà, Victor Moreno, Joan Valls, Elena Hartmann, German Ott, George Wright, Armando Lopez-Guillermo, Wing C. Chan, Dennis D. Weisenburger, Randy D. Gascoyne, Thomas M. Grogan, Jan Delabie, Elaine S. Jaffe, Emili Monserrat, Hans-Konrad Müller-Hermelink, Louis M. Staudt, Andreas Rosenwald, and Elias Campo

ABSTRACT

Purpose

To compare the genetic relationship between cyclin D1–positive and cyclin D1–negative mantle cell lymphomas (MCLs) and to determine whether specific genetic alterations may add prognostic information to survival prediction based on the proliferation signature of MCLs.

Patients and Methods

Seventy-one cyclin D1–positive and six cyclin D1–negative MCLs previously characterized by gene expression profiling were examined by comparative genomic hybridization (CGH).

Results

Cyclin D1–negative MCLs were genetically characterized by gains of 3q, 8q, and 15q, and losses of 1p, 8p23-pter, 9p21-pter, 11q21-q23, and 13q that were also the most common alterations in conventional MCLs. Parallel analysis of CGH aberrations and locus-specific gene expression profiles in cyclin D1–positive patients showed that chromosomal imbalances had a substantial impact on the expression levels of the genes located in the altered regions. The analysis of prognostic factors revealed that the proliferation signature, the number of chromosomal aberrations, gains of 3q, and losses of 8p, 9p, and 9q predicted survival of MCL patients. A multivariate analysis showed that the gene expression–based proliferation signature was the strongest predictor for shorter survival. However, 3q gains and 9q losses provided prognostic information that was independent of the proliferative activity.

Conclusion

Cyclin D1–positive and –negative MCLs share the same secondary genetic aberrations, supporting the concept that they correspond to the same genetic entity. The integration of genetic information on chromosome 3q and 9q alterations into a proliferation signature–based model may improve the ability to predict survival in patients with MCL.

J Clin Oncol 25:1216-1222. © 2007 by American Society of Clinical Oncology

INTRODUCTION

Mantle cell lymphoma (MCL) is an aggressive B-cell non-Hodgkin's lymphoma that makes up 5% to 10% of all human B-cell lymphomas.¹ MCL is genetically characterized by the chromosomal translocation t(11;14)(q13;q32) resulting in juxtaposition of the cyclin D1 gene and the immunoglobulin heavy chain enhancer, leading to constitutive overexpression of cyclin D1.² In addition to cyclin D1 deregulation, secondary chromosomal alterations also play a pivotal role in MCL lymphomagenesis (eg, by disturbing the highly coordinated cell cycle regulation or the response to DNA damage).³ Various studies us-

ing conventional cytogenetics,^{4,5} comparative genomic hybridization (CGH),⁶⁻¹⁰ and array-based CGH¹¹⁻¹³ have revealed a high number of such secondary chromosomal alterations in MCL, including gains in 3q, 6p, 7p, 8q, 10p, 12q, and 18q as well as losses of 1p, 6q, 8p, 9p, 9q, 11q, and 13q. Crucial target genes such as *p16^{INK4a}* in 9p21,^{14,15} *BMI-1* in 10p12,¹⁶ *ATM* in 11q22.3,¹⁷⁻¹⁹ *CDK4* in 12q14,²⁰ and *p53* in 17p13^{21,22} have been identified. In addition, alterations in a number of chromosomal regions show a clear association with the clinical course of MCL patients.^{7,10,11,23} In contrast to cyclin D1–positive MCL, data on genetic alterations in the recently defined small subgroup of cyclin D1–negative MCL is lacking.²⁴

Chromosomal Imbalances in MCL

Recently, the Leukemia and Lymphoma Molecular Profiling Project conducted a comprehensive gene expression profiling study of MCL specimens and identified the proliferation signature as a biologic integrator of various oncogenic events and as a powerful predictor of survival, allowing the definition of prognostic subgroups that differ in median survival by more than 5 years.²⁵ However, the correlation between the gene expression–based measurement of tumor cell proliferation (proliferation signature) and underlying secondary genetic alterations in MCL has not yet been elucidated. Secondary chromosomal alterations may deregulate a large number of genes that influence the biologic behavior of the tumor. In a previous study in diffuse large B-cell lymphoma, we demonstrated that chromosomal aberrations had a substantial impact on the expression profile of locus-specific genes and improved the predictive value of the gene expression–based prognostic model.²⁶ In the present study, we performed CGH analysis in 77 primary MCL patient samples (71 cyclin D1–positive and six cyclin D1–negative cases) that were studied previously by gene expression profiling²⁵ to address three specific questions. First, we investigated whether the global profile of genetic alterations in cyclin D1–negative MCL²⁴ is similar to conventional MCL overexpressing cyclin D1. Second, we examined the influence of individual chromosomal aberrations on specific gene expression changes. Finally, we evaluated whether specific secondary genetic alterations may provide prognostic information independent from the proliferation signature and, therefore, improve the predicted survival of MCL patients.

PATIENTS AND METHODS

Patient Characteristics

We studied 77 untreated MCL patients who had been characterized previously by gene expression profiling using the Lymphochip cDNA microarray (National Institutes of Health, Bethesda, MD).²⁵ The analysis of genetic alterations of these patients has not been published previously. Tumors were selected for the study on the sole basis of availability of genomic DNA obtained simultaneously with mRNA extraction from the same frozen tissue used for gene expression profiling. Seventy-one tumors were classified as cyclin D1–positive MCL (58 classical and 13 blastoid variants) and six tumors were classified as cyclin D1–negative MCL. Cyclin D1–positive samples had been analyzed previously by real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) for losses of the *p16^{INK4a}*, *ATM*, and *p53* gene loci.²⁵ The proliferation signature of all samples was calculated using the expression levels of 20 proliferation-associated genes.²⁵ Thus, the proliferation signature was built as a continuous variable, ranging from -1.31 to 1.5 . Patients with a proliferation signature below the median (-0.04) were considered as the low proliferation group, whereas those with the index above the median were considered as the high proliferation group.

Clinical data were obtained from all patients according to a protocol approved by the National Cancer Institute Institutional Review Board.

CGH

CGH was performed using a commercially available CGH kit provided by Vysis (Downers Grove, IL). Hybridizations and digital image acquisition, processing, and evaluation were performed on a Cytovision Ultra Workstation (Applied Imaging, Sunderland, United Kingdom) as described previously.⁷ Signal ratios greater than 1.25 or less than 0.75 were considered as chromosomal gains or losses, respectively. Ratios exceeding 1.5 and/or strong focal signals with the ratio profile showing over-representation were considered as high-level DNA amplifications. Complete CGH data are available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sky>.

Statistical Analysis

The association between losses of 9p, 11q, and 17p as detected by CGH and losses of the *p16^{INK4a}*, *ATM*, and *p53* loci analyzed by qPCR²⁵ was evaluated using χ^2 or Fisher's exact test. In addition, odds ratios (ORs) and 95% CI were calculated. Kendall's τ_b (Kt) test was used to assess concordance. To determine the relationship between chromosomal imbalances and the expression levels (as a continuous variable) of the genes located in the corresponding altered chromosomal region (gain versus normal copy number and loss versus normal copy number), the nonparametric Mann-Whitney test was performed. The association between 3q amplification versus gain versus normal and the expression levels of the genes in this region was analyzed by means of the Kruskal-Wallis test. Overall survival was estimated using the Kaplan-Meier method. Cox proportional hazards models were used to estimate hazard ratios (HRs) and calculate 95% CIs. Once a chromosomal abnormality was found to be significant univariately, a likelihood ratio test was used to determine whether this variable added significantly to the survival model based on the proliferation signature.²⁵ When multiple chromosomal alterations or genes were considered in the same analysis, the *P* values were adjusted for multiple comparisons using the false discovery rate method,²⁷ as implemented in the R package *multitest* version 1.10.2 (<http://cran.r-project.org>). Adjusted *P* values less than .05 were considered significant.

RESULTS

Cyclin D1–Positive and Cyclin D1–Negative MCL Share Recurrent Chromosomal Alterations

Clinical characteristics of MCL patients are summarized in Table 1. The median age of the patients was 62 years (range, 38 to 92 years), the ratio of males to females was 58 to 19. Seventy-one patients received multiagent chemotherapy, including rituximab in 10 patients; four patients were not treated, and no information on the treatment was available in two patients. Overall, the clinical characteristics of the cyclin D1–positive and cyclin D1–negative patients were similar (Table 1). All cyclin D1–negative MCLs had a typical morphology. In addition, the gene expression–based proliferation signature of the cyclin D1–positive and cyclin D1–negative tumors showed no statistically significant difference between these two groups (*P* = .46).

Among the 71 cyclin D1–positive MCLs, 64 (90%) showed aberrant profiles by CGH analysis, whereas no chromosomal imbalances were detected in seven cases. Among aberrant cases, a total of 86 gains and 184 losses of chromosomal material were observed. Recurrent chromosomal alterations in cyclin D1–positive and cyclin D1–negative MCLs are listed in Table 2. In cyclin D1–positive tumors, chromosomal alterations occur most frequently in 3q, 1p, 13q, and 11q21–q23 (Fig 1A). No recurrent high-level DNA amplifications were detected. MCL patients with blastoid morphology (13%) showed more frequently losses of 9p21–pter than classical MCL variants (54% v 10%; *P* < .001). Overall, the global profile of genomic imbalances detected in our study is well in accordance with published data.^{6,7,11,13}

In cyclin D1–negative MCL, the most common chromosomal alterations also affected 3q, 13q, and 11q (Table 2; Fig 1B). Although the number of cyclin D1–negative patients is small, these results suggest that these two MCL variants share the same profile of secondary genomic aberrations.

The CGH data in the chromosomal regions 9p21–pter, 11q22–q23, and 17p were in good concordance with deletions of specific target genes as detected by qPCR.²⁵ Specifically, losses of 9p21–pter were significantly associated with deletions of the *p16^{INK4a}* locus (Kt, 0.67; OR, 43.6; 95% CI, 7.2 to 484.6). Similarly, 11q22–q23 losses were

Table 1. Clinical Characteristics of Patients With Cyclin D1-Positive and Cyclin D1-Negative MCL

Characteristic	Cyclin D1 Positive		Cyclin D1 Negative	
	No.	%	No.	%
Total No. of patients	71		6	
Age, years				
Median	63		61	
Range	38-92		54-77	
Sex				
Male	53		5	
Female	18		1	
Histology				
Classic	58	82	6	100
Blastoid	13	18	—	
Ann Arbor stage				
II	8	11	—	
IIIV	70	89	6	100
"B" symptoms	25	36	2	33
ECOG performance status				
0-1	51	72	6	100
≥ 2	12	17	—	
LDH level > normal	26	37	2	33
BM involvement	39	57	6	100
IPI score				
Low risk (0, 1)	16	26	—	
Intermediate risk (2, 3)	35	56	6	100
High risk (4, 5)	11	18	—	
Therapy*				
Combined chemotherapy	57	83	4	66
Combined chemotherapy plus rituximab	9	13	1	17
No treatment	3	4	1	17
Response to therapy (CR + PR)	53 of 66	80	5 of 5	100
Median follow-up, months	23		34	
Median survival, months	28		NR	

Abbreviations: MCL, mantle cell lymphoma; ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; LDH, lactate dehydrogenase; IPI, International Prognostic Index; BM, bone marrow; CR, complete response; PR, partial response; NR, not reached.
*No information on therapy was available for two patients.

associated with deletions of the *ATM* locus by qPCR (KI, 0.55; OR, 13.3; 95% CI, 3.5 to 60.0), and losses of 17p13 with *p53* gene deletions (KI, 0.49; OR, 21.7; 95% CI, 2.5 to 295.8).

Chromosomal Alterations Influence Locus-Specific Gene Expression

To determine the influence of chromosomal imbalances on locus-specific gene expression in cyclin D1-positive patients, the expression level of genes located in seven frequently altered regions (1p21-p31, 3q25-qter, 8p21-pter, 9p21-pter, 9q21-q32, 11q21-q23, and 13q32-q33) were correlated with chromosomal copy number changes. As expected, chromosomal gains and losses were associated with higher or lower expression of a subset of genes within the involved chromosomal regions, respectively. The number of genes with significant changes in gene expression in each band differed between chromosomal regions. For example, among 50 genes in the chromosomal region 3q25-qter represented on the Lymphochip, 24 (48%) were significantly overexpressed in patients with gains and amplifications, including *PIK3CA*, *ACTL6A*, *YEATS2* (3q27), *RFC4* (3q28),

Table 2. Commonly Altered Chromosomal Regions in Cyclin D1-Positive and Cyclin D1-Negative MCL

Alteration	Cyclin D1-Positive MCL (n = 71)		Cyclin D1-Negative MCL (n = 6)	
	No. of Patients	%	No. of Patients	%
Gain				
3q21-qter	23	32	3	50
8q21-qter	8	11	2	33
15q21-qter	8	11	2	33
18q11-q23	8	11	—	
Loss				
1p21-p31	37	52	2	33
13q14-q34	29	41	4	67
11q21-q23	20	28	3	50
6q22-qter	16	22	—	
6q15-q21	13	18	—	
9p21-pter	13	18	2	33
9q21-q32	15	21	1(16%)	17
8p21-pter	9	13	2	33
13q11-q13	12	17	2	33
17p13-pter	9	13	—	

Abbreviation: MCL, mantle cell lymphoma.

and *CENTB2* (3q29; Fig 2A). In contrast, in the chromosomal region 8p21-pter, only 27% of genes present on the Lymphochip showed altered gene expression, with decreased levels as compared with MCL patients with normal gene copy number of this genomic region (Fig 2B). In the 9q21-q32 region, 21 genes (48%) showed decreased expression in patients with chromosomal losses (Fig 2C) and, similarly, 62% of genes were affected by loss of genomic material in 13q32-q33 (Fig 2D), although the number of clones represented on the Lymphochip is relatively low. Regions 9p21-pter and 11q21-q23 were also evaluated, with a percentage of 12.5% and 15% genes deregulated, respectively (Appendix Fig A1, online only). Finally, no significantly downregulated genes were found in the 1p21-p31 region. There were no overexpressed genes in areas of CGH loss, nor were any genes downregulated in regions with chromosomal gains in any of the regions examined.

Prognostic Value of Chromosomal Alterations in MCL

The prognostic value of the global number of chromosomal imbalances and specific altered regions with a frequency higher than 10% was analyzed in the entire set of cyclin D1-positive MCLs. The *P* values were adjusted for the step-up false discovery rate.²⁷ In the univariate analysis, an increased number of CGH alterations (three or more *v* < three alterations per case) was associated with shorter overall survival (OS; median OS, 1.6 *v* 5.1 year, respectively; HR, 2.08; 95% CI, 1.10 to 3.93; *P* = .019). In addition, different chromosomal imbalances were associated with poor OS in MCL patients, namely gains of 3q27-qter (median OS, 2 *v* 3.3 years; *P* = .039; HR, 2.27; 95% CI, 1.19 to 4.32), as well as losses of 8p21-pter (median OS, 0.6 *v* 2.5 years; HR, 2.64; 95% CI, 1.21 to 5.75; *P* = .039), 9p21-pter (median OS, 0.8 *v* 3.3 years; HR, 5.43; 95% CI, 2.44 to 12.0; *P* < .0001), and 9q21-q32 (median OS, 0.8 *v* 3.1 year; HR, 2.36; 95% CI, 1.23 to 4.52; *P* = .039). As previously reported, patients with high proliferation signature

Chromosomal Imbalances in MCL

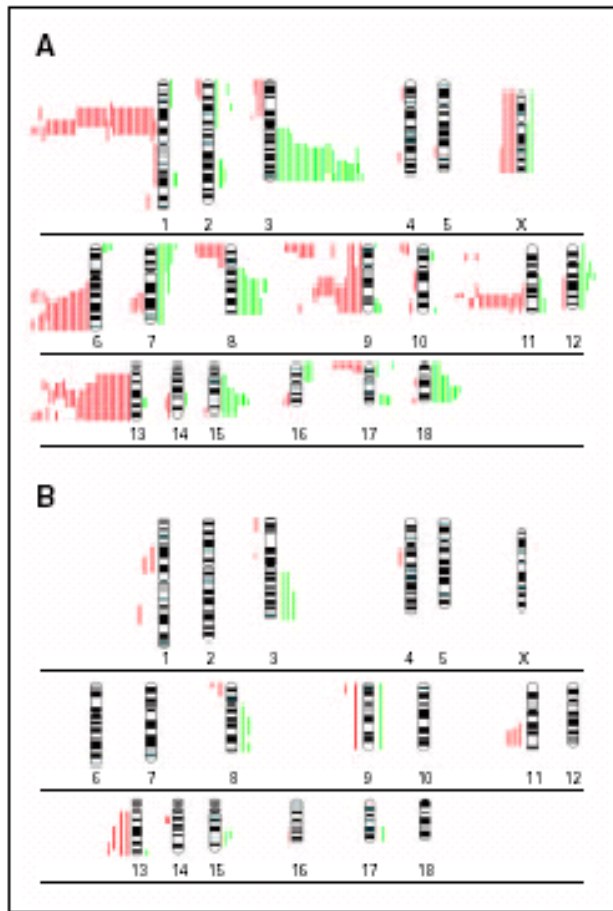


Fig 1. Ideogram of the distribution of gains and losses of genetic material detected by comparative genomic hybridization in (A) cyclin D1-positive mantle cell lymphoma (MCL) and (B) cyclin D1-negative MCL. Red bars on the left side correspond to genetic losses; green bars on the right side indicate genetic gains. Bold bars indicate amplifications.

(median, > -0.04) showed poorer OS than the remainder (median OS, 1.4 v 3.6 years, respectively; HR, 4.28; 95% CI, 2.21 to 8.30; $P < .0001$).

To determine whether the prognostic value of these chromosomal alterations was independent of proliferation, a multivariate analysis was performed including the proliferation signature and all of the CGH alterations with predictive value for OS. The multivariate model showed that proliferation signature (HR, 4.25; 95% CI, 2.16 to 8.36; $P < .0001$), gain of 3q27-qter (HR, 2.51; 95% CI, 1.29 to 4.89; $P = .007$), and loss of 9q21-q32 (HR, 2.48; 95% CI, 1.26 to 4.86; $P = .008$) were associated simultaneously with poor OS. To visualize the independent prognostic value of these two CGH alterations from the proliferation signature, we subdivided the patients into four groups according to their proliferation signature and the presence or absence of the genetic alteration. Interestingly, the alterations in 3q27-qter seem to provide prognostic information predominantly among MCL patients with a low proliferation signature (Fig 3A), whereas losses of 9q21-q32 may have higher impact in the MCL subgroup with increased proliferation signature (Fig 3B).

DISCUSSION

MCL is a well characterized lymphoid neoplasm with the t(11;14) (q13;q32) translocation as the primary genetic event leading to the constant overexpression of cyclin D1.² Recently, the gene expression profile analysis of a large series of MCLs allowed us to identify a particular subset of tumors with the same clinical presentation, morphology, phenotype, and global expression profile as conventional MCL except the lack of cyclin D1 expression and the t(11;14) translocation.^{24,25} These tumors were termed cyclin D1-negative MCL. Interestingly, these patients overexpressed cyclin D2 or D3 suggesting that upregulation of these G1 cyclins could be an alternative mechanism in the pathogenesis of MCL. In this study, we demonstrate that cyclin D1-negative MCL share the same secondary genomic alterations as tumors overexpressing cyclin D1. The most frequent chromosomal aberrations in MCL lacking cyclin D1 were gains of 3q, 8q, and 15q, and losses of 1p, 8p23-pter, 9p21-pter, 11q21-q23, and 13q, which are the same alterations most commonly observed in conventional MCL. Most malignant lymphomas are characterized genetically by a distinct recurrent primary chromosomal translocation such as the t(11;14) in MCL, t(14;18) in follicular lymphoma, or the t(8;14) in Burkitt's lymphoma. In addition, the profile of secondary chromosomal alterations is also relatively specific for each disease entity. For example, MCL and chronic lymphocytic leukemia (CLL) share some common alterations such as losses of 13q and 11q, but isolated trisomy 12 is present almost exclusively in CLL, whereas gains of 3q and losses of 1p are frequent in MCL but rare in CLL.^{26,29} In marginal zone lymphoma, trisomy 3 is a common finding and, although in cyclin D1-positive and cyclin D1-negative MCL gains of 3q are common, trisomy 3 is not observed in our series. In addition, losses of 1p, 11q, and 13q are not a feature of marginal zone lymphomas.^{30,31} Likewise, the combination of secondary chromosomal alterations as demonstrated in this study is not seen in follicular lymphomas that are mainly characterized by gains of chromosome 7, 12, 18, and X, and losses of 6q.³² Therefore, the similar profile of secondary genetic alterations in cyclin D1-positive and cyclin D1-negative tumors observed in our study supports the idea that they correspond to the same biologic entity and share similar genetic pathways of evolution.

The analysis of CGH and expression profile performed in DNA and RNA obtained from the same tissue sample has allowed us to study the relationship between genomic imbalances in MCL and the expression of genes located within altered chromosomal regions, and to identify potentially deregulated target genes. Recent studies in a variety of tumors, among them diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), have demonstrated a correlation between gene copy number changes and the expression level of genes encoded in numerically altered genomic regions.^{26,33-37} In our study, we have examined the relationship between chromosomal imbalances and the expression of genes located in seven commonly altered chromosomal regions, some of them also related to the proliferation of the tumors or the survival of the patients (1p21-p31, 3q25-qter, 8p21-pter, 9p21-pter, 9q21-q32, 11q21-q23, and 13q32-q33). Concordant with our previous findings in DLBCL, between 27% and 62% of genes located within these altered chromosomal regions showed a significant change in expression level in cases with chromosomal alterations. The finding that only a subset of genes shows altered expression levels in chromosomal regions with a genomic gain or loss is well in accordance with published literature in

Salaverria et al

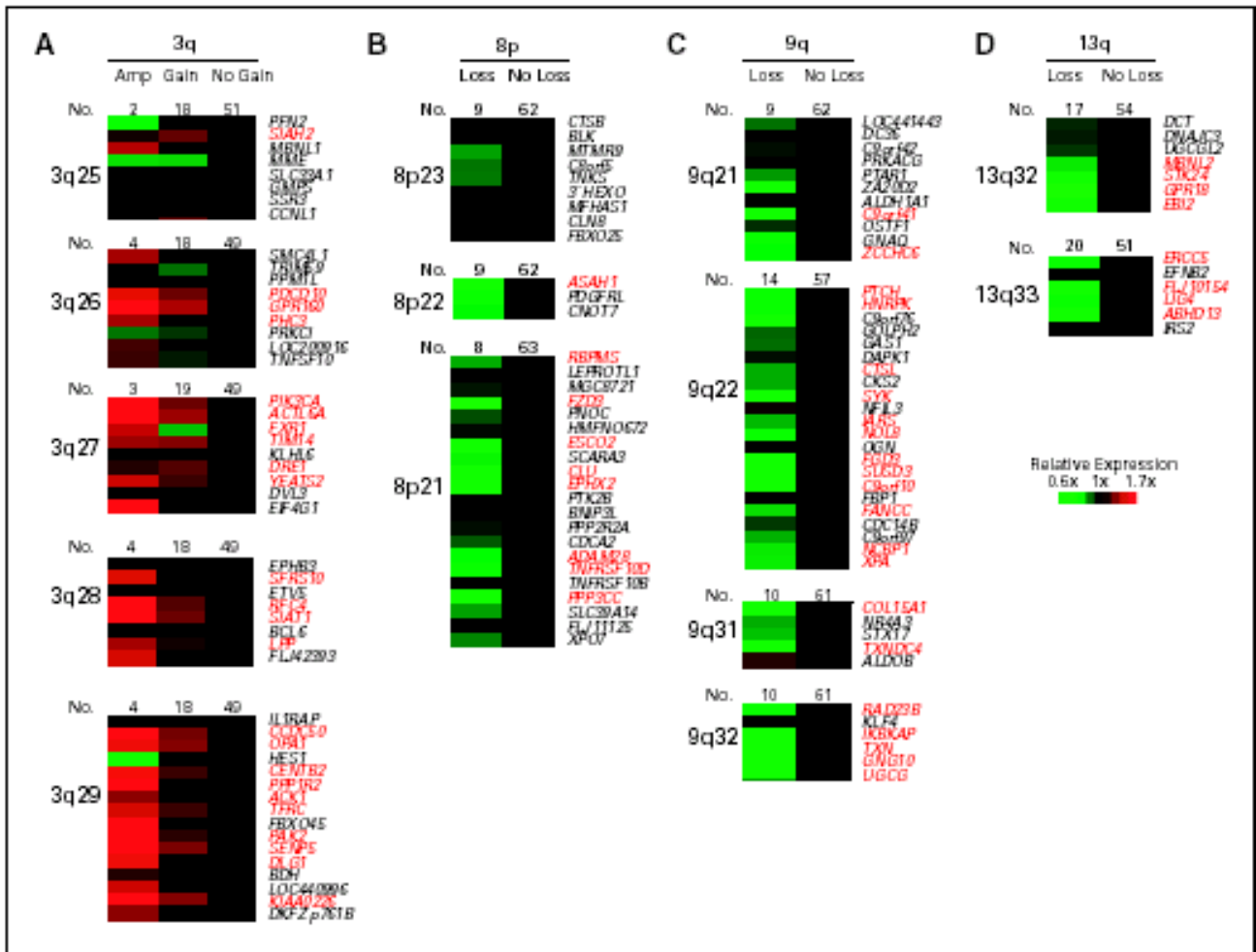


Fig 2. Influence of chromosomal alterations on locus-specific gene expression levels. (A) 3q, (B) 8p, (C) 9q, and (D) 13q. Genes are ordered according to their chromosomal position (Genes On Sequence Map, *Homo sapiens* build 33). For genes with more than one microarray element on the Lymphochip, the average expression from different clones was calculated. Genes with significant differences ($P < .05$) are highlighted in red. Amp, amplification.

other types of lymphomas and in solid cancers.^{33,36} This may be, at least in part, explained by the fact that only a subset of the genome is expressed in the normal counterpart from which the malignant tumor cell is derived. In addition, other genetic alterations or transcriptional deregulation of key regulators in the tumor cell may influence expression levels of genes located in chromosomal regions with genomic imbalances that are independent of underlying DNA copy number alterations. Interestingly, a substantial number of these deregulated genes were related to pathways that may influence the biology of the tumor. Thus, a number of deregulated genes were involved in cell proliferation, such as *YEATS2*, *PICK3*, *ACTL6* (3q27), *RFC4* (3q28), and *CENTB2* (3q29); DNA repair and maintenance of chromosome stability, such as *FANCC* and *XPA* (9q22), *RAD23* (9q32), *ESCO2* (8p21), *ATM* (11q23), *ERCC5*, and *LG4* (13q33); or cellular homeostasis and apoptosis, such as *BIRC2* (11q22), *SLAH2* (3q25), *CASP1* and *CASP4* (11q21), *CLU* and *TNFRSF10D* (8p21), and *PAK2* (3q29).

Gains and amplifications of the chromosomal region 3q25-qter are a common feature of MCL, but also of the activated B-cell-like

subtype of DLBCL, as demonstrated in our previous analysis of DLBCL.²⁶ However, the particular group of genes deregulated by this chromosomal aberration differs in part in the two types of lymphomas. Thus, 29 genes mapped to this region included in the Lymphochip microarray could be evaluated in both types of lymphomas. MCL and activated B-cell-like DLBCL with gains in 3q25-qter had a significant upregulation of 16 (61%) and 10 (34%) of these genes, respectively. Interestingly, seven genes (*SLAH2*, *PDCD10*, *RFC4*, *OPA1*, *PPP1R2*, *PAK2*, and *KIAA0226*) were upregulated in both lymphoma entities, whereas ten (*GPR160*, *PH3*, *PIK3CA*, *FXR1*, *SIAT1*, *LPP*, *CCDC50*, *CENTB2*, *ACK1*, and *TFRC*) and three genes (*GMPS*, *TNSF10*, and *BDH*) were differentially overexpressed only in MCL and activated B-cell-like DLBCL, respectively. These findings suggest that similar chromosomal aberrations in different lymphoma entities may influence the expression of different subsets of genes.

MCL has an aggressive clinical course with a median survival of 3 to 4 years.³⁶ However, clinical studies have recognized that some patients have MCL with a more indolent behavior and have longer survival, whereas others follow a very rapid course and die from the

Chromosomal Imbalances in MCL

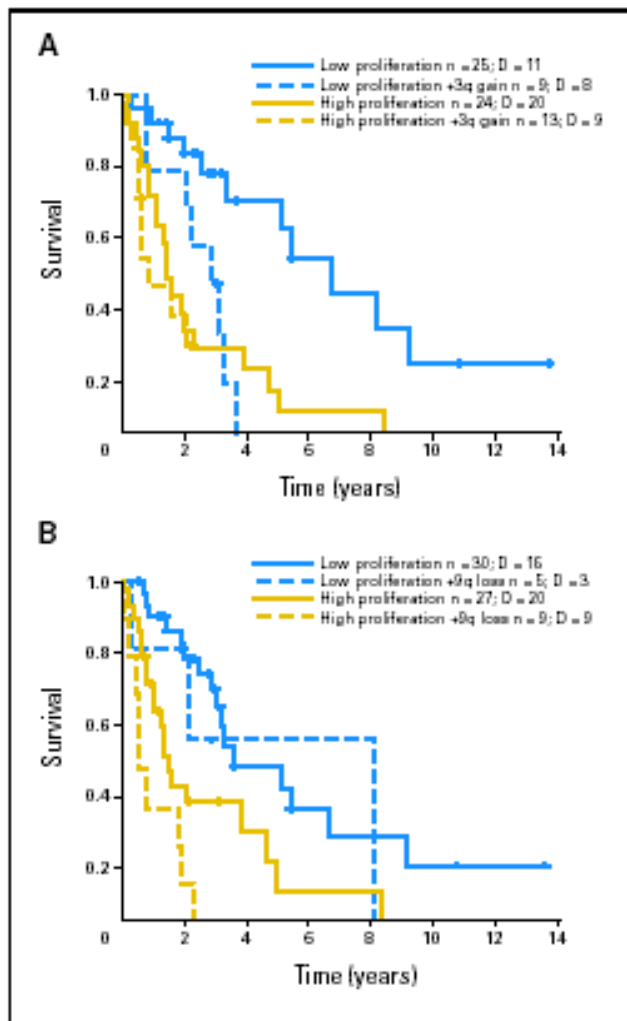


Fig 3. Impact of genomic imbalances on survival of mantle cell lymphoma (MCL) patients. Kaplan-Meier survival estimates of MCL patients (A) with genomic gains of 3q27-qter ($P = .039$) and IBI losses of 9q22-q32 ($P < .009$) in comparison with their stratification into two survival groups based on the gene expression-based proliferation predictor model alone. n, number of patients; D, dead patients.

disease in less than 1 year.^{25,38} Clinical studies have identified several prognostic factors including the International Prognostic Index.^{1,39-41} Molecular investigations have identified tractivation of *p53*, *INK4a-ARF* locus, and high *cyclin D1* expression levels as markers of shorter survival.^{21,25,42} Recently, the proliferative activity has been recognized as a powerful prognostic indicator that probably integrates multiple oncogenic events in the progression of the tumors. The quantification of the expression levels of 20 proliferation-related genes stratified

MCL patients with a difference of almost 6 years in the median survival.²⁵ Conversely, previous genetic studies in MCL observed that gains of chromosome 3q and losses of 8p, 9p, 9q, 13q, and 17p identify patients with a more aggressive clinical evolution.^{7,11,23} However, the relationship between genetic alterations and proliferation as prognostic parameters is not known.

In our study, increased number of chromosomal alterations, gains of 3q27-qter, and losses of 8p21-pter, 9p21-pter, and 9q21-q32 were associated with a poor clinical outcome. Interestingly, the prognostic value of 3q27-qter gains and losses of 9q21-q32 were found to be independent of the gene expression-based proliferation signature. The finding that losses of 9p21-pter do not provide prognostic information to the gene expression-based proliferation signature is expected given the strong association between losses of *p16^{INK4a}* (located at 9p21) and the proliferation of the tumor cells. It is an interesting observation that chromosomal alterations in 3q27-qter and 9q21-q32 seem to influence the evolution of different subsets of tumors. Thus, gains of 3q had a prognostic impact mainly in patients with low proliferation, whereas losses of 9q improved the predictive value in the subgroup of MCL with high proliferation. Therefore, the integration of genetic information (3q and 9q alterations) and the quantitative measurement of tumor cell proliferation (proliferation signature) may improve the ability to predict survival in patients with MCL.

AUTHORS' DISCLOSURES OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

The authors indicated no potential conflicts of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception and design: Itziar Salaverria, Andreas Zettl, Silvia Beà, Andreas Rosenwald, Elias Campo
Financial support: Wing C. Chan, Andreas Rosenwald, Elias Campo
Provision of study materials or patients: German Ott, Armando Lopez-Guillermo, Randy D. Gascoyne, Thomas M. Grogan, Elaine S. Jaffe, Jan Delabie, Wing C. Chan, Dennis D. Weisenburger, Emili Montserrat, Hans-Konrad Muller-Hermelink, Andreas Rosenwald, Elias Campo
Collection and assembly of data: Itziar Salaverria, Andreas Zettl, Silvia Beà, Andreas Rosenwald, Elias Campo
Data analysis and interpretation: Itziar Salaverria, Andreas Zettl, Silvia Beà, Victor Moreno, Joan Valls, Elena Hartmann, George Wright, Armando Lopez-Guillermo, Louis M. Staudt, Andreas Rosenwald, Elias Campo
Manuscript writing: Itziar Salaverria, Andreas Zettl, Silvia Beà, Armando Lopez-Guillermo, Andreas Rosenwald, Elias Campo
Final approval of manuscript: Itziar Salaverria, Andreas Zettl, Silvia Beà, Victor Moreno, Joan Valls, Elena Hartmann, German Ott, George Wright, Armando Lopez-Guillermo, Wing C. Chan, Dennis D. Weisenburger, Randy D. Gascoyne, Thomas M. Grogan, Jan Delabie, Elaine S. Jaffe, Emili Montserrat, Hans-Konrad Muller-Hermelink, Louis M. Staudt, Andreas Rosenwald, Elias Campo

REFERENCES

1. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project: A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 89:3903-3918, 2006
2. Bosch F, Jares P, Campo E, et al: PRAD-1/cyclin D1 gene overexpression in chronic lympho-

3. Fernandez V, Hartmann E, Ott G, et al: Pathogenesis of mantle-cell lymphoma: All oncogenic roads lead to dysregulation of cell cycle and DNA damage response pathways. *J Clin Oncol* 23:6364-6369, 2005
4. Cuneo A, Bigoni R, Rigolin GM, et al: Cytogenetic profile of lymphoma of follicle mantle lineage: Correlation with clinicobiologic features. *Blood* 93:1372-1380, 1999

5. Wlodarska I, Pittaluga S, Hagemeijer A, et al: Secondary chromosomal changes in mantle cell lymphoma. *Haematologica* 84:594-599, 1999
6. Monni O, Dinocan R, Elonen E, et al: Gain of 3q and deletion of 11q22 are frequent aberrations in mantle cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 21:298-307, 1998

Salaverria et al

7. Bea S, Ribas M, Hernandez JM, et al: Increased number of chromosomal imbalances and high-level DNA amplifications in mantle cell lymphoma are associated with blastoid variants. *Blood* 93:4365-4374, 1999
8. Bentz M, Plesch A, Bullinger L, et al: T111;14-positive mantle cell lymphomas exhibit complex karyotypes and share similarities with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 27:285-294, 2000
9. Martínez-Climent JA, Véciana E, Sánchez D, et al: Loss of a novel tumor suppressor gene locus at chromosome 9p is associated with leukemic mantle cell lymphoma. *Blood* 98:3479-3482, 2001
10. Allen JE, Hough PE, Goepel JR, et al: Identification of novel regions of amplification and deletion within mantle cell lymphoma DNA by comparative genomic hybridization. *Br J Haematol* 116:291-298, 2002
11. Kohlhammer H, Schwaben C, Wessendorf S, et al: Genomic DNA-chip hybridization in t(11;14)-positive mantle cell lymphomas shows a high frequency of aberrations and allows a refined characterization of consensus regions. *Blood* 104:795-801, 2004
12. Schraders M, Pfundt R, Straatman HM, et al: Novel chromosomal imbalances in mantle cell lymphoma detected by genome-wide array-based comparative genomic hybridization. *Blood* 105:1698-1693, 2005
13. Tagawa H, Karnan S, Suzuki R, et al: Genome-wide array-based CGH for mantle cell lymphoma: Identification of homozygous deletions of the proapoptotic gene BIM. *Oncogene* 24:1348-1358, 2005
14. Pinyol M, Cobo F, Bea S, et al: P16(INK4a) gene inactivation by deletions, mutations, and hypermethylation is associated with transformed and aggressive variants of non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 91:2977-2984, 1998
15. Dreyling MH, Bullinger L, Ott G, et al: Alterations of the cyclin D1/p16-pRB pathway in mantle cell lymphoma. *Cancer Res* 57:4608-4614, 1997
16. Bea S, Tort F, Pinyol M, et al: BML-1 gene amplification and overexpression in hematological malignancies occur mainly in mantle cell lymphomas. *Cancer Res* 61:2408-2412, 2001
17. Schaffner C, Idler I, Stilgenbauer S, et al: Mantle cell lymphoma is characterized by inactivation of the ATM gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:2773-2778, 2000
18. Camacho E, Hernandez L, Hernandez S, et al: ATM gene inactivation in mantle cell lymphoma mainly occurs by truncating mutations and missense mutations involving the phosphatidylinositol-3 kinase domain and is associated with increasing numbers of chromosomal imbalances. *Blood* 99:238-244, 2002
19. Greiner TC, Dasgupta C, Ho W, et al: Mutation and genomic deletion status of ataxia telangiectasia mutated (ATM) and p53 confer specific gene expression profiles in mantle cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:2352-2357, 2006
20. Hernandez L, Bea S, Pinyol M, et al: CDK4 and MDM2 gene alterations mainly occur in highly proliferative and aggressive mantle cell lymphomas with wild-type INK4a/ARF locus. *Cancer Res* 65:2189-2206, 2005
21. Hernandez L, Fest T, Cazorla M, et al: p53 gene mutations and protein overexpression are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas. *Blood* 87:3351-3359, 1996
22. Greiner TC, Moynihan MJ, Chan WC, et al: p53 mutations in mantle cell lymphoma are associated with variant cytology and predict a poor prognosis. *Blood* 87:4302-4310, 1996
23. Rubio-Moscardo F, Climent J, Siebert R, et al: Mantle-cell lymphoma genotypes identified with CGH to BAC microarrays define a leukemic subgroup of disease and predict patient outcome. *Blood* 105:4445-4454, 2005
24. Fu K, Weisenburger DD, Greiner TC, et al: Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma: A clinicopathologic study based on gene expression profiling. *Blood* 106:4315-4321, 2005
25. Rosenwald A, Wright G, Westner A, et al: The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma. *Cancer Cell* 3:185-197, 2003
26. Bea S, Zettl A, Wright G, et al: Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene-expression-based survival prediction. *Blood* 106:3183-3190, 2005
27. Benjamini Y, Hochberg Y: Controlling the base discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc B* 57:289-300, 1995
28. Bentz M, Huck K, du MS, et al: Comparative genomic hybridization in chronic B-cell leukemias shows a high incidence of chromosomal gains and losses. *Blood* 85:3610-3618, 1995
29. Bea S, Lopez-Guillermo A, Ribas M, et al: Genetic imbalances in progressed B-cell chronic lymphocytic leukemia and transformed large-cell lymphoma (Richter's syndrome). *Am J Pathol* 161:957-968, 2002
30. Dierlamm J, Rosenberg C, Stul M, et al: Characteristic pattern of chromosomal gains and losses in marginal zone B cell lymphoma detected by comparative genomic hybridization. *Leukemia* 11:747-758, 1997
31. Hernandez JM, Garcia JL, Gutierrez NC, et al: Novel genomic imbalances in B-cell splenic marginal zone lymphomas revealed by comparative genomic hybridization and cytogenetics. *Am J Pathol* 158:1843-1850, 2001
32. Viardot A, Moller P, Hogel J, et al: Clinicopathologic correlations of genomic gains and losses in follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 20:4523-4530, 2002
33. Hyman E, Kauraniemi P, Hautaniemi S, et al: Impact of DNA amplification on gene expression patterns in breast cancer. *Cancer Res* 62:6240-6245, 2002
34. Orsetti B, Nugoli M, Carverra N, et al: Genomic and expression profiling of chromosome 17 in breast cancer reveals complex patterns of alterations and novel candidate genes. *Cancer Res* 64:6453-6460, 2004
35. Phillips JL, Hayward SW, Wang Y, et al: The consequences of chromosomal aneuploidy on gene expression profiles in a cell line model for prostate carcinogenesis. *Cancer Res* 61:8143-8149, 2001
36. Pollack JR, Sorlie T, Perou CM, et al: Microarray analysis reveals a major direct role of DNA copy number alteration in the transcriptional program of human breast tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:12963-12968, 2002
37. Virtaneva K, Whight FA, Tanner SM, et al: Expression profiling reveals fundamental biological differences in acute myeloid leukemia with isolated trisomy 8 and normal cytogenetics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:1124-1129, 2001
38. Campo E, Raffeld M, Jaffe ES: Mantle-cell lymphoma. *Semin Hematol* 36:115-127, 1999
39. Bosch F, Lopez-Guillermo A, Campo E, et al: Mantle cell lymphoma: Presenting features, response to therapy, and prognostic factors. *Cancer* 82:567-575, 1998
40. Dreyling M, Lenz G, Hoester E, et al: Early consolidation by myeloablative radiochemotherapy followed by autologous stem cell transplantation in first remission significantly prolongs progression-free survival in mantle-cell lymphoma: Results of a prospective randomized trial of the European MCL Network. *Blood* 105:2677-2684, 2005
41. Argatoff LH, Connors JM, Klasa RJ, et al: Mantle cell lymphoma: A clinicopathologic study of 80 cases. *Blood* 89:2067-2078, 1997
42. Pinyol M, Hernandez L, Cazorla M, et al: Deletions and loss of expression of p16INK4a and p21Waf1 genes are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas. *Blood* 89:272-280, 1997

Acknowledgment

We acknowledge the contributions of Philipp Jehn, Xavier Putg, Liming Yang, Richard Stron, John Powell, Wyndham Wilson, Kat Fu, Timothy Greiner, James Armitage, Daphne de Jong, Joseph M. Connors, Lisa M. Rimsza, Rita Brazziel, Richard I. Fisher, Erlend B. Sneland, Sten Kvaloy, and Harald Holte.

Appendix

The Appendix is included in the full-text version of this article, available online at www.jco.org. It is not included in the PDF version (via Adobe® Reader®).

TREBALL N°3

La leucemització és un procés comú en el Limfoma de

Cè·l·lules del Mantell

(Cancer 109:2473-80, 2007)

La leucemització és un procés freqüent en el Limfoma de Cèl·lules del Mantell

La incidència d'afectació en sang perifèrica en els pacients amb Limfoma de cèl·lules del Mantell (MCL) està entre en 13% i un 77% en les diferents series. El propòsit d'aquest estudi és analitzar la prevalència, la significació biològica i clínica d'aquesta afectació en pacients amb MCL.

L'expressió leucèmica es va analitzar mitjançant morfologia convencional i FC en 48 pacients diagnosticats amb MCL. A més es van estudiar 27 d'aquests pacients mitjançant Hibridació Genòmica Comparada (CGH). Al diagnòstic, 44 pacients (92%) presentaven evidència de leucemització per citometria de flux (FC) , incloent 8 casos (17%) en els que morfològicament no hi havia evidència. A més al recompte de limfòcits es va observar $\geq 5 \times 10^9/L$ en 25 casos (52%). Les alteracions més freqüents detectades per CGH van ser guanys de 3q, 7p, 8q, 9q, 12q i 13q i pèrdues de 13q, 1p, 9p, 11q, 10p, 17p, 6q, 8p i 9q. Utilitzant un cut-off de $5 \times 10^9/L$ limfòcits, els casos amb limfocitosi elevada presentaven més freqüentment guanys de 3q ($p=0.02$), pèrdues de 10p ($p=0.05$), baixa taxa de resposta ($p=0.04$) i una curta supervivència ($p=0.05$).

En resum l'expressió leucèmica detectada al diagnòstic mitjançant FC és altament freqüent a les sèries de pacients amb MCL. Malgrat que morfològicament l'expressió leucèmica no està associada amb alteracions cromosòmiques específiques detectades per CGH, nivells de limfòcits $\geq 5 \times 10^9/L$ es correlacionen amb alteracions específiques i pitjor pronòstic.

Leukemic Involvement Is a Common Feature in Mantle Cell Lymphoma

Ana Ferrer, MD¹
 Itziar Salaverria, BS²
 Francesc Bosch, MD, PhD¹
 Neus Villamor, MD, PhD³
 María Rozman, MD, PhD³
 Sílvia Beà, PhD²
 Eva Giné, MD¹
 Armando López-Guillermo, MD, PhD¹
 Elías Campo, MD, PhD^{2,3}
 Emili Montserrat, MD, PhD¹

¹ Department of Hematology, Hospital Clinic, University of Barcelona, IDIBAPS, Barcelona, Spain.

² Department of Pathology, Hospital Clinic, University of Barcelona, IDIBAPS, Barcelona, Spain.

³ Hematopathology Unit, Hospital Clinic, University of Barcelona, IDIBAPS, Barcelona, Spain.

The first 2 authors contributed equally to this work.

Supported by a grant from Spanish Ministry of Health; Grant number: 05/0213; Grant sponsor: Marató de TV3; Grant number: TV051810; Grant sponsor: Deutsche José Carreras Leukämie-Stiftung; Grant number: D-1643; Grant sponsor: Spanish Ministry of Education and Science, European Union Contract LSHC-CT 2004-503351, and the Lymphoma Research Foundation; Grant number: SAF 05/5855

Dr. Ferrer's Current address: Laboratori de Citologia Hematològica, Department of Pathology, Hospital del Mar, Barcelona, Spain.

Address for reprints: Francesc Bosch, MD, PhD, Department of Hematology, Hospital Clinic, University of Barcelona, Villarroel 170, 08036, Barcelona, Spain; Fax: (011) 34 93 2275484; E-mail: fbosch@clinic.ub.es

Received November 16, 2006; revision received February 7, 2007; accepted February 12, 2007.

© 2007 American Cancer Society
 DOI 10.1002/cncr.22715
 Published online 3 May 2007 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

BACKGROUND. The reported incidence of peripheral blood involvement in patients with mantle cell lymphoma (MCL) ranges from 13% to 77%. The aim of the study was to analyze the prevalence and the biologic and clinical significance of leukemic involvement in a series of patients with MCL.

METHODS. Leukemic expression was assessed by conventional morphology and flow cytometry (FC) in 48 patients. In addition, comparative genomic hybridization (CGH) was performed in 27 patients.

RESULTS. At diagnosis, 44 patients (92%) had evidence of leukemic expression by FC, including 8 patients (17%) without morphologically apparent leukemic involvement. Moreover, a lymphocyte count $\geq 5 \times 10^9/L$ was observed in 25 cases (52%). The most frequent imbalances detected by CGH were gains of 3q, 7p, 8q, 9q, 12q, and 13q, and losses of 13q, 1p, 9p, 11q, 10p, 17p, 6q, 8p, and 9q. Using a cutoff of $5 \times 10^9/L$ lymphocytes, cases with lymphocytosis more frequently presented with gains of 3q ($P = .02$), losses of 10p ($P = .05$), a low response rate ($P = .04$), and a short survival ($P = .05$).

CONCLUSIONS. Leukemic expression at diagnosis detected by FC was found to be highly frequent in this series of patients with MCL. Although morphologically apparent leukemic expression was not associated with specific chromosomal alterations detected by CGH, a lymphocyte count $\geq 5 \times 10^9/L$ was correlated with particular genetic abnormalities and a poor outcome. *Cancer* 2007;109:2473–80. © 2007 American Cancer Society.

KEYWORDS: mantle cell lymphoma, leukemic involvement, comparative genomic hybridization, flow cytometry.

Mantle cell lymphoma (MCL) is a lymphoid neoplasm derived from mature B-cells usually coexpressing CD5 and histologically characterized by a nodular or diffuse proliferation of atypical lymphocytes. Two cytologic variants of MCL have been identified, classical and blastoid, with the last including pleomorphic and blastic subtypes.¹ MCL is genetically characterized by the presence of t(11;14)(q13;q32), which juxtaposes the *Cyclin D1* gene (11q13) with the *IgH* gene (14q32).² This alteration leads to the overexpression of cyclin D1, which plays an important role in cell cycle control at G₁-S transition³ by overcoming the suppressor effect of the retinoblastoma protein (Rb)⁴ and *p27^{Kip1}*.⁵ *Cyclin D1* overexpression is a highly specific molecular marker of MCL because it is expressed in virtually all of these tumors but only in a few cases of aggressive chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma and multiple myeloma. In addition, Cyclin D1 is overexpressed at the mRNA and protein levels in a high number of hairy cell leukemias, although its expression is much lower than in MCLs and is not associated with *Cyclin D1* gene rearrangement or amplification.⁶

Different studies using conventional cytogenetics,^{7,8} comparative genomic hybridization (CGH),⁹⁻¹² and array-based CGH¹³⁻¹⁵ have shown that MCLs carry a high number of chromosomal and genetic alterations, some of which are associated with aggressive histologic variants and an adverse outcome.¹⁶⁻¹⁹

From the clinical standpoint, MCL is a relatively uncommon type of B-cell lymphoma that represents 5% to 10% of non-Hodgkin lymphomas. MCL is more frequent in elderly males, who are diagnosed in an advanced stage of the disease with frequent extranodal involvement (eg, bone marrow, gastrointestinal tract, or Waldeyer ring). MCL has an adverse clinical course characterized by poor response to conventional chemotherapy and a median overall survival (OS) of 3 to 5 years.²⁰⁻²²

To our knowledge, relatively few studies to date have focused on the bone marrow and peripheral blood involvement in MCL. It is interesting to note that the incidence of leukemic expression varies highly in different studies, ranging from 13% to 77%.²¹⁻²⁵ This discrepancy could be due to patient selection bias and different morphologic and immunophenotypic criteria to define leukemic expression. Moreover, in many of these series a central histologic review or extensive immunophenotypic characterization of the samples were not performed. In addition, studies comparing genetic abnormalities between patients with nodal and leukemic MCL have suggested that, although both display similar genomic patterns of losses and gains, specific alterations may be associated with leukemic dissemination and a poor prognosis. In particular, the analysis of genetic alterations in leukemic cases demonstrated that genomic loss of chromosome 8p21.3 at the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor gene cluster occurred more frequently in these patients than in those with lymph node disease.^{26,27}

In view of this background, we investigated the incidence of peripheral blood involvement in a large series of patients with MCL by both morphologic and immunophenotypic analysis. In addition, clinical features, genetic abnormalities detected by CGH, and patient outcome were determined.

MATERIALS AND METHODS

Patients and Samples

Forty-eight patients diagnosed with MCL from 1988 to 2002 in a single institution (Department of Hematology, Hospital Clinic, Barcelona, Spain) were included in this study on the basis of sample avail-

ability for flow cytometry (FC) analysis. Diagnosis of MCL was established according to the World Health Organization (WHO) criteria and was confirmed by histologic, immunophenotypic, genetic, and molecular studies. Patients were selected only if a histologic specimen suitable for establishing the diagnosis of MCL was available. The following samples were collected and analyzed for this study: peripheral blood from all the patients, lymph node (38 patients), spleen (8 patients), tonsil (4 patients), gastrointestinal biopsy (2 patients), liver, and breast (1 patient each). In 7 patients different tissues were analyzed (lymph nodes and spleen in 5, liver and spleen in 1, lymph node and bowel in 1). Informed consent was required from all patients in accordance with the local ethics committee guidelines.

Staging maneuvers at diagnosis included thoracic, abdominal, and pelvic computed tomography and unilateral bone marrow biopsy (47 patients). Biopsies of other extranodal sites were performed whenever their involvement was suspected.

The following initial data were recorded and evaluated for analysis in each patient: 1) clinical data (age, gender, performance status according to the Eastern Cooperative Oncology Group [ECOG] scale, and the presence of B-symptoms [fever, night sweats, weight loss]); 2) histologic data (typical or blastoid, nodular, mantle-zone, or diffuse variants); 3) hematologic and biochemical parameters (leukocyte and lymphocyte counts, presence of atypical lymphocytes in peripheral blood, hemoglobin, platelet count, serum lactate dehydrogenase [LDH], and β_2 -microglobulin levels); 4) tumor extension data (lymph node and extranodal involvement, number of extranodal involved sites, splenomegaly, hepatomegaly, Ann Arbor stage, and bone marrow infiltration); and 5) the International Prognostic Index (IPI), defined by the International non-Hodgkin Lymphoma Prognostic Factors Project.

Complete response (CR) was defined as the total disappearance of tumor masses and disease-related symptoms as well as the normalization of the initial abnormal tests for at least 1 month. Partial response (PR) was considered when tumor masses or organ infiltration decreased by at least 50% along with the disappearance of disease-related symptoms. Patients not included in these categories and early deaths were considered nonresponders.

Morphologic, Histologic, and Immunophenotypic Analysis of MCL Cells

Tissue biopsies were classified according to the currently accepted histologic criteria. Immunophenotype of malignant cells was obtained by standard

immunohistochemical methods performed in frozen or formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. Cyclin D1 overexpression was demonstrated in all the cases by immunohistochemistry.

Slides of peripheral blood and bone marrow were stained with May-Grunwald-Giemsa, whereas bone marrow biopsy sections were stained with hematoxylin and eosin. Two independent observers (N.V. and M.R.) reviewed peripheral blood slides, counting a minimum of 500 cells per case, and bone marrow trephines to determine the number and morphologic characteristics of circulating atypical cells, as well as the pattern and extent of bone marrow infiltration. Overt leukemic expression was defined as the presence of >5% lymphocytes with atypical morphology in peripheral blood.

The presence of MCL cells in peripheral blood was also assessed using a direct immunofluorescence technique. Fifteen thousand cells were acquired in a FACScan flow cytometer (Becton-Dickinson, San Jose, Calif) and analyzed using Paint-a-gate software (Becton-Dickinson). The panel of monoclonal antibodies included at least CD10, CD19, CD20 or CD22, CD23, kappa and lambda light chains, a pan-T-cell marker (CD2 or CD3), and CD5. The presence of a distinct CD5-positive, CD23-negative B-cell population demonstrating strong CD20 or CD22, and the detection of light chain restriction in B cells were considered indicative of leukemic involvement.

Cytogenetic and Molecular Analysis

Cytogenetics and molecular genetics

Cytogenetic and molecular studies were performed to confirm the diagnosis of MCL. Conventional cytogenetic analysis was performed on tumor cells isolated from bone marrow or peripheral blood as described elsewhere.²⁸ In 14 patients, the classic t(11;14)(q13;q32) was demonstrated and in 2 additional cases the t(11;14) was detected by fluorescence in situ hybridization (FISH). Moreover, 11q13 rearrangement was demonstrated in 14 additional patients by polymerase chain reaction (PCR) analysis according to previously described techniques.²⁹

Comparative genomic hybridization

High molecular weight DNA was extracted from 17 lymph nodes and 10 involved peripheral blood using the standard Proteinase K/RNase treatment and phenol-chloroform extraction. Normal DNA was obtained from 2 healthy blood donors (1 man and 1 woman). DNA was diluted to a concentration of 40–60 ng/ μ L and 1 μ L of each sample was analyzed in a 0.8% agarose gel and stained with ethidium bromide to verify quality and concentration.

CGH was performed using a commercially available CGH kit provided by Vysis (Downers Grove, Ill). Hybridizations and digital image acquisition, processing, and evaluation were performed on a Cytovision Ultra workstation (Applied Imaging, Sunderland, UK) as described previously.¹⁰

Signal ratios >1.25 or <0.75 were considered chromosomal gains or losses, respectively. Ratios exceeding 1.5 and/or strong focal signals with the ratio profile showing overrepresentation were considered high-level DNA amplifications. CGH alterations present in at least 5 cases (19%) were selected and tested for their correlation with clinical data.

Statistical Methods

Differences among patient subgroups were compared using the Fisher exact test (2-tailed) and the Student *t* test. OS was defined as the time from diagnosis to the time of death. Patients still alive at the time of last follow-up were censored at the last known date of contact. The actuarial survival analysis was performed according to the method of Kaplan and Meier³⁰ and differences in survival between patient groups were analyzed by the log-rank test. *P*-values $\leq .05$ were considered statistically significant.

RESULTS

Patient Characteristics

The main initial characteristics of the 48 patients are detailed in Table 1. The median age was 64 years (range, 40–84 years) and 75% of patients were men. Thirty-six patients (75%) were diagnosed with typical morphologic variant and 12 were diagnosed with blastoid morphology (25%), including pleomorphic (2 cases) and blastic (10 cases) subtypes. MCL demonstrated a diffuse growth pattern in 41 cases, nodular in 6 cases, and mantle-zone in 1 case.

The median leukocyte count was $11.6 \times 10^9/L$ (range, 1.1 – $412 \times 10^9/L$). A lymphocyte count $\geq 5 \times 10^9/L$ was observed in 25 cases (52%), whereas 17 patients (35%) presented with $\geq 10 \times 10^9/L$ lymphocytes. Sixteen patients (33%) presented with Hb <100 g/L and the platelet count was $<120 \times 10^9/L$ in 42%. As per the IPI, 3 patients (6%) were of low risk, 29% were of low-intermediate risk, 40% of high-intermediate risk, and 25% of high risk. Bone marrow was infiltrated in 40 of 47 patients, although only 27 bone marrow biopsy sections were available for review. The pattern of bone marrow involvement was nodular in 3 patients (10%), interstitial in 8 patients (30%), both nodular and interstitial in 8 patients (30%), and diffuse in another 8 patients (30%).

TABLE 1
Main Initial Characteristics of 48 Patients With Mantle Cell Lymphoma

Variable	Percent
Age ≥ 60 y	51
Sex (men)	75
Morphologic variant	
Typical	75
Blastoid	25
Performance status (ECOG ≥ 2)	33
B-symptoms	46
Bulky disease	17
Hepatomegaly	35
Splenomegaly	66
Increased serum LDH levels ^a	53
Increased serum β_2 -microglobulin levels [†]	61
Advanced stage (Ann Arbor III-IV)	98
Extranodal involvement	96
Bone marrow infiltration	85
≥ 2 extranodal involved sites	35
High/intermediate-risk and high-risk IPI	66

ECOG indicates Eastern Cooperative Oncology Group; LDH, lactate dehydrogenase; IPI, International Prognostic Index.

^a Data were available for 47 patients.

[†] Data were available for 36 patients.

Treatment varied over time and included chemotherapeutic regimens without anthracyclines in 15 patients (31%) and combination therapy including anthracyclines in 33 patients (69%). All patients were assessable for response. CR, PR, and failure rates were 13%, 46%, and 41%, respectively. After a median follow-up of 29 months (range, 1–138 months), 40 patients (83%) had died. The median OS of the series was 30 months.

Peripheral Blood Morphology and Immunophenotype

The morphologic review of May-Grunwald-Giemsa-stained peripheral blood smears disclosed that 36 of 48 patients (75%) had overt, morphologically apparent, leukemic expression at the time of diagnosis. The median leukocyte count in patients with overt leukemia was $14.8 \times 10^9/L$ (range, 2.4 – $412 \times 10^9/L$) and the median lymphocyte count was $8.5 \times 10^9/L$ (range, 0.7 – $400 \times 10^9/L$), with 11 patients having less than $5 \times 10^9/L$ lymphocytes. The median percentage of atypical lymphocytes was 43% (range, 13%–91%). In the majority of the cases, morphologic analysis demonstrated a mixture of typical MCL cells and small lymphocytes. Occasional blastoid cells were observed in peripheral blood but the proportion of these cells was always inferior to 5% of lymphocytes. Among patients with morphologically apparent leukemic expression, 39% had a hemoglobin level <100 g/L and 53% a platelet count $<120 \times 10^9/L$. The his-

tologic analyses of such patients showed that 28 patients (78%) had typical MCL histology (including 3 with nodular and 1 with mantle-zone pattern), whereas 8 presented with blastoid variants (7 blastic cases and 1 pleomorphic case).

Eight of 12 patients (67%) with no morphologically apparent leukemic expression disclosed a characteristic MCL lymphocyte population in peripheral blood by FC. As expected, FC was also positive for MCL in all patients with overt leukemic expression. A total of 44 patients (92%) had evidence of leukemic involvement by FC. The remaining 4 cases from this series presented normal peripheral blood morphology, immunophenotypic analysis of lymphocytes, and bone marrow biopsy. The median percentage of the monoclonal B-cell population was 79% for the 36 patients presenting with morphologically apparent leukemic expression (range, 28–97%) and 32% (14–74%) for the 8 patients with peripheral blood involvement only detectable by FC. Among the patients with positive FC, the phenotype was considered typical (CD5+, CD23–) in 40 patients. In 3 cases MCL cells expressed CD23 (41%, 61%, and 73%, respectively), whereas the remaining case presented with weak expression of CD5 (25% of B lymphocytes being positive) confirmed by immunohistochemistry.

Chromosomal Alterations of Leukemic MCL

Twenty-seven MCL samples were analyzed by CGH, with 23 corresponding to patients with overt leukemic expression, 3 from patients with peripheral blood involvement only detected by FC, and 1 with normal peripheral blood morphology and FC. Twenty-five patients (93%) demonstrated chromosome alterations with a mean number of 5.7 ± 4.4 per sample, displaying an elevated total number of gains ($n = 86$) and losses ($n = 69$). Only 1 patient had a single alteration that was a loss of 1p22-p32. The most frequent gains were on chromosomes 3q (55%), 7p (26%), 8q (22%), 9q (22%), 12q (22%), and 13q (19%) (Fig. 1) (Table 2). High-level DNA amplifications were identified in 11 different regions of the genome, with 18q22-qter being the most recurrent amplified region (15%). Minimal common gained regions were limited to 3q23-qter, 7p15-pter, 8q23-qter, 9q34-qter, 12q12-q13, and 13q22-q31.

The most frequent losses were found on chromosomes 13q (37%), 1p (26%), 11q (26%), 9p (26%), 10p (22%), 17p (22%), 6q (19%), 8p (19%), and 9q (19%). The regions frequently involved by loss of genetic material were delineated to 1p22-p31, 11q22-q23, 9p21-pter, 10p14-pter, 17p12-pter, 6q24-qter, 8p21-pter, and 9q21-q22. On chromosome 13q, 2 different areas of loss were identified (13q11-q21 and

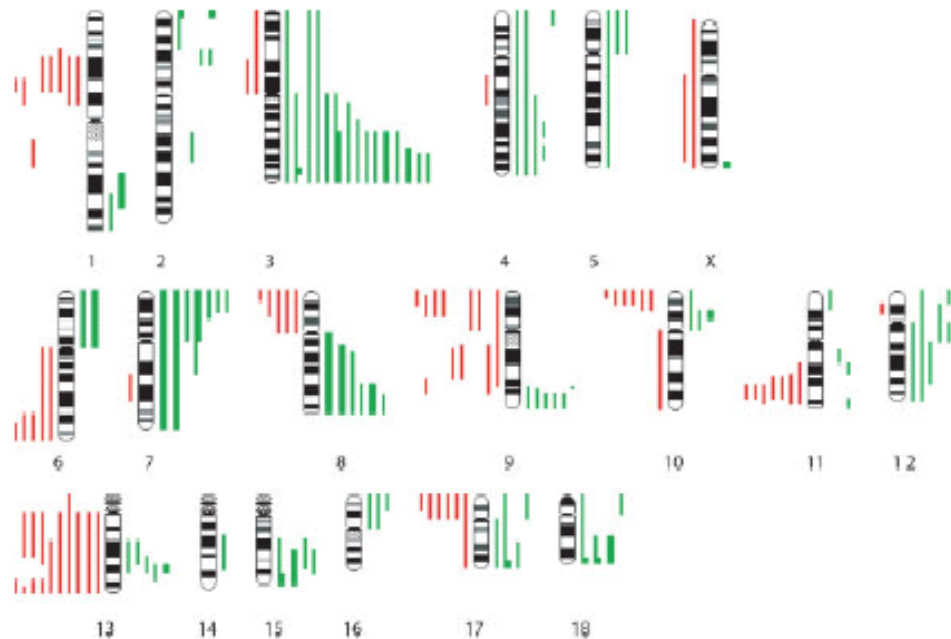


FIGURE 1. Ideogram of the distribution of gains and losses of genetic material detected by comparative genomic hybridization in 27 cases of mantle cell lymphoma. Red bars on the left correspond with genetic losses, whereas the green bars on the right indicate genetic gains. Bold bars indicate amplifications. Each line represents a gained or lost region in a single tumor.

TABLE 2
CGH Alterations in MCL According to Lymphocyte Count

	Lymphocyte count		
	$\geq 5 \times 10^9/L$ N = 16	$< 5 \times 10^9/L$ N = 11	Total N = 27
Gains			
3q [*]	12 (75%)	3 (27%)	15 (55%)
7p	4 (25%)	3 (27%)	7 (26%)
9q	4 (25%)	2 (18%)	6 (22%)
8q	4 (25%)	2 (18%)	6 (22%)
12q	3 (19%)	3 (27%)	6 (22%)
13q	4 (17%)	1 (9%)	5 (19%)
Losses			
13q	5 (31%)	5 (45%)	10 (37%)
1p	3 (19%)	4 (36%)	7 (26%)
9p	4 (25%)	3 (27%)	7 (26%)
11q	5 (31%)	2 (18%)	7 (26%)
10p [*]	6 (37%)	0 (0%)	6 (22%)
17p	5 (31%)	1 (9%)	6 (22%)
6q	3 (19%)	2 (18%)	5 (19%)
8p	3 (19%)	2 (18%)	5 (19%)
9q	1 (6%)	4 (36%)	5 (19%)

CGH indicates comparative genomic hybridization; MCL, mantle cell lymphoma.

* $P \leq .05$.

13q32-qter). Tumors with 17p loss had more chromosomal imbalances than patients with a normal chromosome 17 profile (9.3 ± 6.15 vs 4.7 ± 3.3 , respectively; $P = .05$). However, cases with a lymphocyte count $\geq 5 \times 10^9/L$ (16 of 27 patients; 59%) more

frequently had gains of 3q and losses of 10p than patients with less than $5 \times 10^9/L$ lymphocytes (75% vs 27% [$P = .02$] and 37% vs 0% [$P = .05$], respectively) (Table 2).

Correlation Between Leukemic Expression, Initial Features, and Outcome

We compared the clinical and biological characteristics of patients with apparent morphologic leukemic expression and those with normal morphology. Patients with overt leukemic expression more frequently had a poor performance status (ECOG ≥ 2 ; $P = .04$), palpable splenomegaly ($P = .01$), and lower platelet counts ($< 120 \times 10^9/L$; $P = .007$) than patients with normal peripheral blood smears. No differences in terms of other clinical and biological variables were found. In addition, patients with lymphocyte counts $\geq 5 \times 10^9/L$ had different initial variables (Table 3), and also a lower response rate (44% vs 74%; $P = .04$) and a shorter survival than those with less than $5 \times 10^9/L$ lymphocytes (median OS of 23 vs 35 months, respectively; $P = .05$) (Fig. 2).

DISCUSSION

In this study we analyzed the initial characteristics; the morphologic, immunophenotypic, and genomic profiles; and the outcome of 48 patients with newly diagnosed MCL according to whether there was

TABLE 3
Prognosis According to Lymphocyte Count

	Lymphocyte count		P
	$< 5 \times 10^9/L$, N = 23	$\geq 5 \times 10^9/L$, N = 25	
ECOG ≥ 2	5 (22%)	11 (44%)	.03
Platelet count $< 120 \times 10^9/L$	6 (26%)	14 (56%)	.04
Hemoglobin level < 100 g/L	4 (17%)	12 (48%)	.03
Lymphadenopathy	18 (78%)	20 (80%)	NS
Splenomegaly	11 (48%)	20 (80%)	.03
Response rate (CR + PR)	17 (74%)	11 (44%)	.04
Median OS	35 mo	23 mo	.05

ECOG indicates Eastern Cooperative Oncology Group; NS, not significant; CR, complete response; PR, partial response; OS, overall survival.

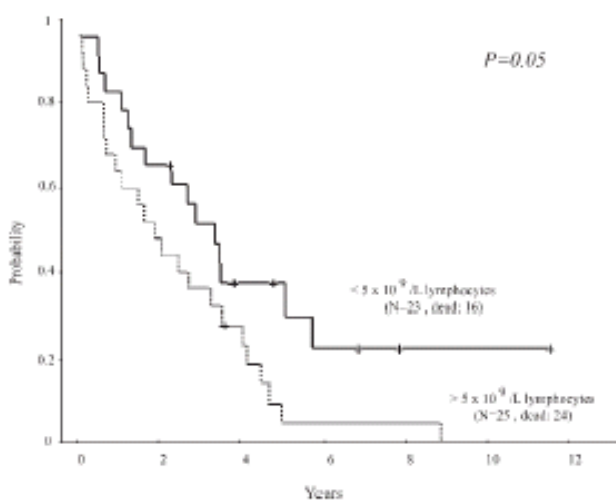


FIGURE 2. Overall survival curve of 48 patients with mantle cell lymphoma according to the lymphocyte count in the peripheral blood. The median survival for patients with a lymphocyte count $\geq 5 \times 10^9/L$ was 23 months versus 35 months for patients without lymphocytosis.

involvement of peripheral blood detected on morphologic grounds or by FC.

Although peripheral blood and bone marrow involvement in MCL is a well-known feature, to our knowledge its incidence and clinical significance have not been fully analyzed. Thus, peripheral blood involvement has been reported in 13% to 77% of the patients, depending on the series. However, many of these studies include a small number of patients with primarily lymph disease and lack well-defined morphologic and immunophenotypic criteria to define leukemic expression.²¹⁻²³ Recently, some studies have focused on patients with MCL presenting with marked lymphocytosis and overt leukemia, mainly describing the morphologic spectrum of circulating lymphoma cells and the histologic pattern of bone

marrow biopsy.^{24,31-36} In contrast, peripheral blood immunophenotyping by FC has not been thoroughly analyzed in MCL patients, and just a small number of cases showing peripheral blood involvement only detectable by FC have been reported.²⁴ In a recent study published by Gu et al,³⁷ FC on peripheral blood and bone marrow samples was performed to determine the value of *Cyclin D1/IgH* rearrangement detected by FISH in leukemic MCL. FC was positive for MCL in only 26% of the peripheral blood or bone marrow samples. In our study, after an extensive FC analysis, leukemic involvement was detected in almost all patients (92%), including cases without morphologically apparent leukemia. The differences found in peripheral blood involvement between our study and that published by Gu et al. could be explained by the unexpected low percentage of bone marrow involvement detected by those authors.

The neoplastic MCL cells are monoclonal B-cells with relatively intense surface immunoglobulins, coexpressing CD5 and negative for CD23 and CD10. In the current series, 8% of the cases presented with an atypical immunophenotype (weak expression of CD5 or positivity for CD23), a similar proportion to that previously reported.^{21,31,33,36} It is interesting to note that these cases had an unequivocal diagnosis of MCL supported by tissue histology, Cyclin D1 expression, and the presence of t(11;14)(q13;q32).

In addition to the t(11;14)(q13;q32), many genetic aberrations have been described in MCL. It has recently been proposed that genomic loss of chromosome 8p occurs more frequently in patients with leukemic disease, defined as $>10\%$ CD5+/CD19+ cells in the peripheral blood, than in lymph node MCL with no blood involvement.²⁶ Moreover, in a small series of cases of leukemia with t(11;14), the most frequent additional genetic abnormality was the loss of 8p.²⁷ Of note, these patients presented with lymphocytosis without nodal involvement at diagnosis. The genomic alterations found in our series were concordant with those generally observed in MCL.^{7-11,13} In contrast to the findings described in leukemic variants,^{15,26,27} we did not find a deletion of 8p as a specific marker for leukemic involvement. In total, we found a genomic loss of 8p in 5 patients, 4 of whom presented with morphologically apparent leukemic involvement and the remaining case with MCL cells detected only by FC. This discrepancy in the prevalence of 8p losses could be explained by different criteria for selection of patients as well as by the different definition of leukemic involvement. In this sense, in the present series the diagnosis of MCL was based on histologic and molecular criteria, in opposition to other studies

that selected cases among different chronic B-cell lymphoproliferative disorders on the basis of the presence of t(11;14). It is interesting to note that t(11;14) has been described in a variety of hematologic neoplasms, including B-prolymphocytic leukemia. Furthermore, some of these studies lacked strict immunophenotyping criteria to define peripheral blood involvement. In this regard, selection criteria based on the presence of CD5+/CD19+ cells without clonal light chain analysis could not ensure the presence of MCL cells in peripheral blood.

No differences concerning the genomic pattern of losses and gains were observed between patients with and without morphologically apparent leukemic involvement, which is not surprising when considering that most patients had leukemic expression detected by FC. However, MCL cases with $\geq 5 \times 10^9$ /L lymphocytes more frequently presented gains of 3q and losses of 10p. The gain of 3q, with a minimal common region at 3q26.1–27 was first detected by CGH in 1998 in 52% of MCLs.⁹ Thereafter, cytogenetic studies identified different secondary alterations in MCLs, including gains and trisomies of chromosome 3, which was confirmed by CGH by our group¹⁰ and others.^{8,15,26,27} With regard to losses of 10p, this alteration has been previously reported in MCL^{8,10} but, to the best of our knowledge, no related genetic targets have been described.

Several clinical and biological factors have been shown to have a prognostic impact in MCL. Thus, patients aged >60 years at diagnosis, with poor performance status, splenomegaly, advanced disease stage, and extranodal involvement are expected to have a short survival. In addition, and from the biologic standpoint, blastoid morphology, diffuse pattern, high Ki-67 index, increased mitotic activity, and TP53 gene abnormalities have been associated with an unfavorable outcome.^{21,22,38,39} The prognostic impact of peripheral blood involvement in MCL is controversial.^{21,22,31} Some studies have shown that the presence of absolute lymphocytosis at diagnosis is associated with a shorter survival,^{23,25} particularly when lymphocyte counts are greater than 10×10^9 /L.^{33,40} In contrast, other studies have shown that the survival of patients with leukemic MCL does not differ from that of patients with lymph node disease.^{24,36} In the current study, the overall median survival for the entire series was 30 months and no differences were observed between patients with overt leukemic MCL and the group without morphologic evidence of leukemic involvement. Circulating lymphoma cells detected either by morphology or by FC may be a manifestation of the biology of this disease rather than a poor prognostic indicator. How-

ever, it is important to note that patients with $\geq 5 \times 10^9$ /L lymphocytes had different genetic abnormalities and clinical outcome.

In conclusion, in the current series of patients with MCL, leukemic expression at the time of diagnosis detected by FC was a highly common feature even in patients with a normal lymphocyte count. It is important to note that a lymphocyte count $\geq 5 \times 10^9$ /L was associated with specific genetic abnormalities and a poor outcome. New studies are warranted to define biologic factors that determine leukemic involvement.

REFERENCES

1. Swerdlow SH, Berger F, Isaacson PI, et al. Mantle cell lymphoma. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, eds. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press; 2001:168–170.
2. Motokura T, Bloom T, Kim HG, et al. A novel cyclin encoded by a cell-linked candidate oncogene. *Nature*. 1991;350:512–515.
3. Jiang W, Kahn SM, Zhou P, et al. Overexpression of cyclin D1 in rat fibroblasts causes abnormalities in growth control, cell cycle progression and gene expression. *Oncogene*. 1993;8:3447–3457.
4. Dowdy SF, Hinds PW, Louie K, et al. Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins. *Cell*. 1993;73:499–511.
5. Tong W, Pollard JW. Genetic evidence for the interactions of cyclin D1 and p27(Kip1) in mice. *Mol Cell Biol*. 2001; 21:1319–1328.
6. Bosch F, Jares P, Campo E, et al. PRAD-1/cyclin D1 gene overexpression in chronic lymphoproliferative disorders: a highly specific marker of mantle cell lymphoma. *Blood*. 1994;84:2726–2732.
7. Cuneo A, Bigoni R, Rigolin GM, et al. 13q14 deletion in non-Hodgkin's lymphoma: correlation with clinicopathologic features. *Haematologica*. 1999;84:589–593.
8. Wlodarska I, Pittaluga S, Hagemeijer A, Wolf-Peters C, Van Den BH. Secondary chromosome changes in mantle cell lymphoma. *Haematologica*. 1999;84:594–599.
9. Monni O, Oinonen R, Elonen E, et al. Gain of 3q and deletion of 11q22 are frequent aberrations in mantle cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 1998;21:298–307.
10. Bea S, Ribas M, Hernandez JM, et al. Increased number of chromosomal imbalances and high-level DNA amplifications in mantle cell lymphoma are associated with blastoid variants. *Blood*. 1999;93:4365–4374.
11. Bentz M, Plesch A, Bullinger L, et al. t(11;14)-positive mantle cell lymphomas exhibit complex karyotypes and share similarities with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2000;27:285–294.
12. Allen JE, Hough RE, Goepel JR, et al. Identification of novel regions of amplification and deletion within mantle cell lymphoma DNA by comparative genomic hybridization. *Br J Haematol*. 2002;116:291–298.
13. Kohlhammer H, Schwaenen C, Wessendorf S, et al. Genomic DNA-chip hybridization in t(11;14)-positive mantle cell lymphomas shows a high frequency of aberrations and allows a refined characterization of consensus regions. *Blood*. 2004;104:795–801.

14. Schraders M, Pfundt R, Straatman HM, et al. Novel chromosomal imbalances in mantle cell lymphoma detected by genome-wide array-based comparative genomic hybridization. *Blood*. 2005;105:1686-1693.
15. Rubio-Moscardo F, Climent J, Siebert R, et al. Mantle-cell lymphoma genotypes identified with CGH to BAC microarrays define a leukemic subgroup of disease and predict patient outcome. *Blood*. 2005;105:4445-4454.
16. Hernandez L, Hernandez S, Bea S, et al. c-myc mRNA expression and genomic alterations in mantle cell lymphomas and other nodal non-Hodgkin's lymphomas. *Leukemia*. 1999;13:2087-2093.
17. Fernandez V, Hartmann E, Ott G, Campo E, Rosenwald A. Pathogenesis of mantle-cell lymphoma: all oncogenic roads lead to dysregulation of cell cycle and DNA damage response pathways. *J Clin Oncol*. 2005;23:6364-6369.
18. Hernandez L, Bea S, Pinyol M, et al. CDK4 and MDM2 gene alterations mainly occur in highly proliferative and aggressive mantle cell lymphomas with wild-type INK4a/ARF locus. *Cancer Res*. 2005;65:2199-2206.
19. Salaverria I, Perez-Galan P, Colomer D, Campo E. Mantle cell lymphoma: from pathology and molecular pathogenesis to new therapeutic perspectives. *Haematologica*. 2006;91:11-16.
20. Weisenburger DD, Armitage JO. Mantle cell lymphoma—an entity comes of age. *Blood*. 1996;87:4483-4494.
21. Argatoff LH, Connors JM, Klasa RJ, Horsman DE, Gascoyne RD. Mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study of 80 cases. *Blood*. 1997;89:2067-2078.
22. Bosch F, Lopez-Guillermo A, Campo E, et al. Mantle cell lymphoma: presenting features, response to therapy, and prognostic factors. *Cancer*. 1998;82:567-575.
23. Duggan MJ, Weisenburger DD, Ye YL, et al. Mantle zone lymphoma. A clinicopathologic study of 22 cases. *Cancer*. 1990;66:522-529.
24. Cohen PL, Kurtin PJ, Donovan KA, Hanson CA. Bone marrow and peripheral blood involvement in mantle cell lymphoma. *Br J Haematol*. 1998;101:302-310.
25. Samaha H, Dumontet C, Ketterer N, et al. Mantle cell lymphoma: a retrospective study of 121 cases. *Leukemia*. 1998;12:1281-1287.
26. Martinez-Climent JA, Vizcarra E, Sanchez D, et al. Loss of a novel tumor suppressor gene locus at chromosome 8p is associated with leukemic mantle cell lymphoma. *Blood*. 2001;98:3479-3482.
27. Vizcarra E, Martinez-Climent JA, Benet I, et al. Identification of two subgroups of mantle cell leukemia with distinct clinical and biological features. *Hematol J*. 2001;2:234-241.
28. Espinet B, Sole F, Woessner S, et al. Translocation (11;14)(q13;q32) and preferential involvement of chromosomes 1, 2, 9, 13, and 17 in mantle cell lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 1999;111:92-98.
29. Pinyol M, Campo E, Nadal A, et al. Detection of the bcl-1 rearrangement at the major translocation cluster in frozen and paraffin-embedded tissues of mantle cell lymphomas by polymerase chain reaction. *Am J Clin Pathol*. 1996;105:532-537.
30. Kaplan EL, Meier P. Non-parametric estimation for incomplete observations. *J Am Stat Assoc*. 1958;53:457-481.
31. Wong KF, Chan JK, So JC, Yu PH. Mantle cell lymphoma in leukemic phase: characterization of its broad cytologic spectrum with emphasis on the importance of distinction from other chronic lymphoproliferative disorders. *Cancer*. 1999;86:850-857.
32. Viswanatha DS, Foucar K, Berry BR, et al. Blastic mantle cell leukemia: an unusual presentation of blastic mantle cell lymphoma. *Mod Pathol*. 2000;13:825-833.
33. Schlette E, Lai R, Onciu M, et al. Leukemic mantle cell lymphoma: clinical and pathologic spectrum of twenty-three cases. *Mod Pathol*. 2001;14:1133-1140.
34. Onciu M, Schlette E, Bueso-Ramos C, Medeiros LJ. Leukemic mantle cell lymphoma with cells resembling polymorphocytes. *Am J Clin Pathol*. 2002;118:305-306.
35. Wong KF, So CC, Chan JK. Nucleolated variant of mantle cell lymphoma with leukemic manifestations mimicking polymorphocytic leukemia. *Am J Clin Pathol*. 2002;117:246-251.
36. Matutes E, Parry-Jones N, Brito-Babapulle V, et al. The leukemic presentation of mantle-cell lymphoma: disease features and prognostic factors in 58 patients. *Leuk Lymphoma*. 2004;45:2007-2015.
37. Gu J, Huh YO, Jiang F, et al. Evaluation of peripheral blood involvement of mantle cell lymphoma by fluorescence in situ hybridization in comparison with immunophenotypic and morphologic findings. *Mod Pathol*. 2004;17:553-560.
38. Campo E, Raffeld M, Jaffe ES. Mantle-cell lymphoma. *Semin Hematol*. 1999;36:115-127.
39. Tiemann M, Schrader C, Klapper W, et al. Histopathology, cell proliferation indices and clinical outcome in 304 patients with mantle cell lymphoma (MCL): a clinicopathological study from the European MCL Network. *Br J Haematol*. 2005;131:29-38.
40. Pittaluga S, Verhoef G, Criel A, et al. Prognostic significance of bone marrow trephine and peripheral blood smears in 55 patients with mantle cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 1996;21:115-125.

TREBALL N°4

**La combinació d'anàlisi genètico-moleculars mostra nous punts
recurrents en Limfoma de Cèl·lules del Mantell**

(En preparació)

La combinació d'anàlisi genètico-moleculars mostra nous punts recurrents en Limfoma de Cèl·lules del Mantell

El limfoma de cèl·lules del mantell (MCL) està caracteritzat per translocacions a 11q13 que porten a la sobre-expressió de CCND1, malgrat tot s'ha postulat que existeixen alteracions secundàries addicionals que contenen gens diana que podrien tenir un important paper en la progressió de la malaltia. Per determinar les alteracions secundàries hem analitzat 25 mostres de MCL i 10 línies cel·lulars utilitzant multicolor fluorescence *in situ* hybridization (M-FISH), FISH i comparative genomic hybridization (CGH). Hem detectat la t(11;14)(q13;q32) en els 19 casos alterats; i també hem vist que el 83% dels casos mostrava alteracions numèriques i estructurals (58 i 73, respectivament). A banda dels cromosomes 11 i 14, els cromosomes més implicats en els reordenaments va ser els cromosomes 1, 8, i 10. No vam trobar altres translocacions recurrents a banda de la t(11;14). Les 10 línies cel·lulars de MCL estudiades mostraven la t(11;14) i alteracions numèriques i estructurals en cariotips amb alta complexitat (excepte JVM-2). En total vam identificar 17 punts de trencament recurrents, sent 1p22 i 8p11 els més implicats (en quatre casos i en dues línies cel·lulars cadascún). Els punts de trencament 1p32, 3q25, 4q11, 8p11, 8q11, 10p14, 11q23, i 15q22 han estat identificats com a punts de trencament associats a translocació per primer cop en MCL. Els cromosomes més implicats en reordenaments en línies cel·lulars van ser 1, 8, i 9. Un fet interessant és la troballa cinc tumors i 4 línies cel·lulars presentaven translocacions t(11;14) complexes implicant de forma preferent el cromosoma 8. En resum la combinació de tècniques de citogenètica molecular ha permès definir de forma més precisa el perfil i la naturalesa dels desequilibris genètics en la patogènesi dels MCLs; ressaltant que a més de la t(11;14), no es van trobar altres translocacions recurrents. A més hem observat que els MCL presenten cariotips complexes amb un elevat nombre de alteracions numèriques i estructurals, les quals s'originen en diferents punts de trencament donant lloc a diferents translocacions equilibrades i desequilibrades; l'estudi d'aquests punts de trencaments pot donar llum sobre els mecanismes genètics implicats a la patogènesi dels MCL.

A combination of molecular cytogenetic analyses reveals novel recurrent breakpoints in Mantle cell lymphoma

Itziar Salaverria¹, Blanca Espinet², Ana Carrió¹, Dolors Costa¹, Laura Astier², Julia Slotta-Huspenina³, Falko Fend³, Francesc Solé², Dolors Colomer¹, Sergio Serrano², Rosa Miró⁴, Sílvia Beà^{1*}, Elías Campo^{1*}

¹Hematopathology Unit, Department of Pathology, Hospital Clinic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi I Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Barcelona, Spain

²Laboratory of Cytogenetics and Molecular Biology, Department of Pathology, Hospital del Mar, Barcelona, Spain

³Institute of Pathology, Technical University Munich, Munich, Germany

⁴Department of Cellular Biology, Physiology and Immunology and Immunology Institute of Biotechnology and Biomedicine, Autonomous University of Barcelona, Bellaterra, Spain.

*S.B. and E.C. are co-senior authors of this study

This study was supported by the Spanish Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) SAF05/5855, Instituto de Salud Carlos III, Red Temática de Cáncer (G03/10), Red temática limfomas (G03/179), Grant “Distinció per a la Promoció a la Recerca de la Generalitat de Catalunya” (60BA200406008), Grant “Ajut de suport a grups de recerca consolidats de la Generalitat de Catalunya” (1-2005-SGR00870), the Lymphoma Research Foundation, and Beca Marató de TV3 (Càncer)(2004-2007)

Address correspondence to: Elias Campo, Hematopathology Section, Hospital Clinic, Villarroel 170, 08036-Barcelona, Barcelona, Spain. Phone 34 93 227 5450, Fax 34 93 227 5717. Email: ecampo@clinic.ub.es

Abbreviated title: M-FISH ANALYSIS OF MCL

ABSTRACT

Mantle cell lymphoma (MCL) is characterized by 11q13 translocations leading to the overexpression of *CCND1*, however, it has been postulated that additional secondary genomic alterations harboring target genes may be important in the progression of this disease. To determine these secondary alterations we have analyzed 25 MCL samples and 10 MCL cell lines using multicolor fluorescence *in situ* hybridization (M-FISH), FISH and comparative genomic hybridization (CGH). We detected the t(11;14)(q13;q32) in the 19 altered cases, additionally, 83% showed numerical and structural aberrations (58 and 73, respectively). Besides 11 and 14, the most involved chromosomes in rearrangements were 1, 8, and 10. Furthermore, there were no other recurrent translocations. All 10 MCL cell lines studied showed t(11;14) and structural and numerical alterations in highly complex karyotypes (except JVM-2). Overall, we identified 17 recurrent breakpoints, being 1p22 and 8p11 the most involved (in four cases and 2 cell lines each). Breakpoints 1p32, 3q25, 4q11, 8p11, 8q11, 10p14, 11q23, and 15q22 have been identified as associated to structural alterations in MCL for the first time. The most often rearranged chromosomes in cell lines were 1, 8, and 9. Interestingly, five tumors and four cell lines displayed a complex t(11;14) involving preferentially chromosome 8. In conclusion, the combination of molecular-cytogenetic techniques allowed us to define more precisely the profile and nature of the genetic imbalances in MCL pathogenesis, highlighting that besides t(11;14), no other recurrent translocations were found. Furthermore MCL harbor complex karyotypes with a high number of both structural and numerical alterations which are originated in several common breakpoints leading to different balanced and unbalanced translocations. The study of these breakpoints could give new insights in the genetic mechanisms implicated in MCL pathogenesis.

INTRODUCTION

Mantle cell lymphoma (MCL) is an aggressive lymphoid neoplasm genetically characterized by chromosomal translocation t(11;14)(q13;q32) and its molecular counterpart *BCL-1* rearrangement, leading to the overexpression of *CCND1* gene. *CCND1* is encoded by two major mRNA transcripts of approximately 4.5 and 1.5 Kb that differ in the length of the 3' untranslated region (UTR) but contain the whole coding region. About 4-10% of the MCLs lack the 4.5 kb transcript expressing mRNAs with shorter 3' UTR that lack the destabilizing AUUUA sequences. The loss of these regulatory sequences have been described to be associated to additional translocations in the 3' region of this gene (Seto et al., 1992; Rimokh et al., 1994), microdeletions or point mutations (Wiestner et al., 2007).

Experimental studies have shown that *CCND1* can function as an oncogene but its tumorigenic and transforming properties seem to be less effective than other oncogenes. On the other hand, *CCND1* transgenic animals do not develop spontaneous lymphomas and lymphomagenesis in these animals requires the cooperation with other oncogenes such as *MYC* (Lovec et al., 1994). All these findings suggest that other mechanisms, in addition to *CCND1* deregulation, may participate in the development and progression of MCLs. These other mechanisms presumably are secondary genomic alterations, usually affecting large chromosomal regions that may contain many candidate genes.

Different studies using conventional cytogenetics (Cuneo et al., 1999; Wlodarska et al., 1999; Espinet et al., 1999), Comparative Genomic Hybridization (CGH) (Monni et al., 1998; Bea et al., 1999; Bentz et al., 2000; Martinez-Climent et al., 2001; Allen et al., 2002; Jarosova et al., 2004), array-based CGH (Kohlhammer et al., 2004; Rubio-Moscardo et al., 2005; Schraders et al., 2005; Tagawa et al., 2005), and 10K SNP array (Rinaldi et al., 2006) have shown that MCLs carry high number of chromosomal

alterations and have defined minimal altered regions as well as common sites of breakage. One of the altered genes that plays a pivotal role in MCL is *ATM*, which inactivation (usually by mutations of one allele accompanied by deletion of the other allele) is found in 40 to 75% of the cases (Schaffner et al., 2000; Camacho et al., 2002). Moreover, *ATM* inactivation in typical MCL is associated to high number of chromosomal alterations (Camacho et al., 2002). Additionally, other target genes deregulated in MCL pathogenesis belong to two main cell cycle regulation pathways (*INK4a-CDK4-RB1* and *ARF-MDM2-p53*)(Jares et al., 2007).

Common fragile sites (CFS) are heritable specific chromosome loci that exhibit an increased frequency of gaps, poor staining, constrictions or breaks when chromosomes are exposed to partial DNA replication inhibition. CFS are a potential resource of chromosomal breakpoints associated with cancer, correlating significantly with breakpoints that lead to chromosomal rearrangements (Durkin & Glover, 2007). In MCL the association between high-level DNA amplifications and fragile sites has been previously reported (Bea et al., 1999), suggesting a possible role of CFS in the amplification of certain chromosomal regions.

Metaphase and array-CGH analyses have been very useful to define common chromosomal regions with copy number changes and narrowing down minimal altered regions, but chromosomal translocations are not detectable by these techniques. However, they can be easily identified by multicolor fluorescence *in situ* hybridization FISH (M-FISH) technique that is a very powerful tool that facilitates the karyotyping of tumor genomes and allows the identification of complex chromosomal rearrangements, cryptic translocations, and marker chromosomes undetectable by conventional cytogenetics. This provides a more precise quantification of intermetaphase heterogeneity and allows also to define common breakpoints implicated in balanced and unbalanced

translocations. Here we report combined M-FISH and CGH analysis in a series of MCL and cell lines, which revealed that recurrent breakpoints rather than recurrent translocations could be relevant for pinpointing key regions involved in MCL pathogenesis.

MATERIAL AND METHODS

Patients

In this study, we have analyzed 23 MCL obtained at diagnosis from Hospital Clinic (Barcelona) and Hospital del Mar (Barcelona). Seventeen cases present typical morphology and 6 blastoid variant of MCL. Two relapsed samples from two different patients (obtained 1 and 2 years after diagnosis) were included in the study. The series consisted of 15 men and 8 women, with a mean age of 67 years (range 42-81). The following samples were collected and analyzed for this study: peripheral blood (19 cases), bone marrow (3 cases), spleen (2 cases), and lymph node (1 case). The analysis of sixteen samples was performed from previously cryopreserved lymphoid cells using the standard protocol (McConnell et al., 1990; Bosga-Bouwer et al., 2001) and the remaining samples from fresh material. Clinical data were available for all cases.

MCL Cell Lines

Five MCL-derived cell lines: HBL-2 (kindly provided by Dr. Dreyling, Munich, Germany), MAVER-1 (kindly provided by Dr. Alberto Zamò, Verona, Italy), MINO (kindly provided by Dr. Andreas Rosenwald, Wuerzburg, Germany), UPN-1 (kindly provided by Dr. Ali G Turhan, Villejuif, France), and Z-138 were analyzed. Cells were grown as previously described (Camps et al., 2006). Results previously published from

other 5 MCL cell lines (JVM-2, GRANTA-519, REC-1, JEKO-1 and NCEB-1) were included in the analysis (Camps et al., 2006).

Cytogenetic and Fluorescence *in situ* Hybridization Studies

Cytogenetic studies were performed in all patients as previously described (Espinet et al., 1999). Karyotypes were described according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN 1995). M-FISH assay hybridization procedure (Speicher et al., 1996) was performed on cultured cells. Briefly, slides were pre-treated with RNase/2× SSC (10 ng/mL) for 30 min at 37°C, Pepsin/HCl (0.1–1 mg/mL) for 5 minutes, formaldehyde-free acid (1%) for 2 minutes and in PBS/MgCl₂ for 10 minutes at room temperature. After being dehydrated in ethanol series and air dried, slides were denatured in 70% formamide solution at 70°C for 2 minutes. M-FISH probe (Vysis-Abott, Downers Grove, IL) was denatured for 5 minutes at 72°C. Ten µl of the probe solution were added to each slide, which was covered by a coverslip. The preparations were hybridized at 37°C overnight in a humid chamber. Post-hybridization washings consisted in 2 minutes each in 0.4 × SSC at 70°C and in 2× SSC at room temperature.

FISH analysis were performed following manufacturer's recommendations. FISH analysis for the detection of t(11;14)(q13;q32) was performed using the dual-color dual-fusion probe *CCND1* (11q13) orange/*IGH* (14q32) green (Vysis-Abott, Downers Grove, IL). Locus specific FISH probe LSI *ATM/CEP11* (Qbiogene, Morgan Irving, CA) was used to identify copy number changes of this locus. Whole chromosome painting (WCP) probes for chromosomes 8, 19, and Y and centromeric CEP 8 probe were used in order to elucidate several complex translocations (Vysis-Abbot, Downers Grove, IL). Hybridizations and digital image acquisition, processing, and evaluation were performed using ISIS digital image analysis system V5.0 (Metasystem, Altussheim, Germany).

Destaining of G-banded chromosome preparations helped considerably with the identification of complex rearrangements. All karyotypes are available at the website:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sky/>

Comparative Genomic Hybridization (CGH)

Metaphase CGH was performed using a commercially available CGH kit provided by Vysis-Abbot (Downers Grove, IL). Hybridizations and digital image acquisition, processing, and evaluation were performed on a Cytovision Ultra Workstation (Applied Imaging, Sunderland, UK) as described previously (Bea et al., 1999). Complete CGH data are available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sky/>

Molecular Analysis

Copy number status of *ATM* gene was performed by real-time quantitative PCR (RQ-PCR) with genomic DNA as previously described (Salaverria et al., 2008). Moreover, to evaluate the expression of *CCND1* we performed real-time quantitative reverse transcription-PCR (RT-PCR) with primers and probes for total *CCND1*, *CCND1* 3'UTR and TBP (as control housekeeping gene) as previously described (Slotta-Huspenina et al., 2007).

Statistical Analysis

Differences in the subgroups of MCL in terms of the parameters evaluated were compared by the Student's *t*-test. Overall survival (OS) was defined as the time from diagnosis to the time of death. Patients still alive were censored at the last known date of contact. The actuarial survival analysis was performed according to the method described

by Kaplan and Meyer, and differences in OS were analyzed by the log-rank test. *P* values ≤ 0.05 were considered to indicate statistical significance.

RESULTS

MCL Showed High Number of Structural and Numerical Alterations but no Secondary Recurrent Rearrangements

Nineteen of the 23 patients analyzed by M-FISH (83%) showed aberrations (Table 1) whereas four cases presented normal karyotypes, possibly corresponding to the growth of normal cells. As other authors have reported (Bosga-Bouwer et al., 2001) we found significant differences in the number of analyzable metaphases per slide between fresh sample cells and defrosted cells (12 ± 4.7 vs. 8.4 ± 2.1 ; $P=0.019$). Two relapsed samples were also analyzed and showed the same karyotype than the initial sample in both cases, one with no alterations, and the other (case M14) with the same structural and numerical alterations. Combined cytogenetic analysis detected the MCL-hallmark $t(11;14)(q13;q32)$ in all altered cases, moreover it was found as a single abnormality in two of them. M-FISH revealed new alterations not detected by G-Banding in 11 (58%) of the abnormal cases. Fifty-eight numerical (range 0-16, mean 3.1 imbalances/alterated case), and 73 structural aberrations (range 1-9, mean 3.8 imbalances/alterated case) were observed. Eighty-seven structural non-clonal alterations were also observed (mean 4.6 alterations/case). No differences were found between typical and blastoid variants of MCL in terms of total number of alterations (6.8 ± 5 vs. 7.5 ± 5.6) and number of non-clonal rearrangements (5.2 ± 5.2 vs. 3.2 ± 5.4). We evaluated *ATM* deletions using RQ-PCR and FISH and found eight cases with deletion (in six of them loss of 11q22-q23 was also detected by CGH and M-FISH). In the eight cases in which *ATM* deletion was detected, no significant differences were observed in terms of number of alterations between cases

with and without the deletion of this locus, although the median of alterations was higher in the deleted cases (8.1 ± 5.7 vs. 4.7 ± 5).

Structural rearrangements were detected in all altered patients. Moreover, structural rearrangements were found as sole abnormalities in six cases. In addition to t(11;14), no other recurrent structural aberrations were identified, although translocations involving chromosomes 8, 10, and 1 were frequently seen (9, 8, and 7 rearrangements, respectively) (Figure 1A). Three cases presented highly complex karyotypes (Cases M2, M12, and M13) with high number of numerical and structural alterations: 19, 12, and 18 abnormalities, respectively (Figure 1B).

To study the instability pattern of these series of MCL, we calculated the modal number variability and the non-clonal structural variability as we performed previously with five MCL cell lines (Supplementary table 1) (Camps et al., 2006). The majority of the cases displayed high level of instability in contrast to four cases with low levels (M4, M7, M16, and M17). Moreover, no differences were observed regarding *ATM* gene status (deleted vs. not deleted) and genomic instability in terms of modal number variability and non-clonal structural variability.

To define precisely breakpoints and small copy number changes, CGH was performed in 20 cases with available DNA. The analysis revealed that seventeen of the 20 (85%) showed chromosomal alterations, that consisted of 105 alterations (50 gains, 3 amplifications, and 52 losses). Two cases with no alterations by M-FISH showed CGH alterations. The most frequent alterations were gains of 2q (15%), 3q (30%), 8q (40%), 12q (20%) and 15q (20%) and losses of 1p (15%), 6q (20%), 8p (30%), 9p (15%), 10p (15%), 11q (35%), 13q (25%), and 17p (15%). Minimal common altered regions detected at least in three cases were delineated at: 1p22, 2q22-q31, 3q25-qter, 6q22-qter, 8p23, 8q24, 9p24, 10p15, 11q22-q23, 12q15-q21 and 15q22-q24 (Figure 2). By CGH we have

been able to describe two common breakpoints not detected by M-FISH related with gain of material.

Common Breakpoints in MCL Cases

Breakpoints derived from M-FISH analysis were strictly revised and matched with the results obtained from CGH analysis. In this sense, recurrent breakpoints were identified at 1p22, 1p32, 3q25, 3q29, 4q11, 8p11, 8q11, 10p14, 11q13, 11q21, 11q23, 12p13, 14q32, 15q22 and 19q11 (two cases each, except 11q21 and 11q23, found in three cases, 1p22 and 8p11 found in four cases and 11q13 and 14q32 found in all cases) (Figure 2). As expected, 11q13 and 14q32 breakpoints were found in all cases due to the MCL-hallmark $t(11;14)(q13;q32)$. Remarkably, 1p22 and 8p11 were found in a relatively high proportion of cases (21%). The breakpoint 1p22 leads to an interstitial loss of the short arm of chromosome 1 in 3/4 cases, this region corresponds to the most frequently lost in MCL (Tagawa et al., 2005). On the other hand, all cases with 8p11 breakpoint, showed chromosome 8 rearrangement. Three of these cases showed a complex rearrangement and interestingly, in two of them (M6 and M9) the rearrangement involved *CCND1* and *IGH* loci (Figure 3A-B), and in the third case (M13) the derivative chromosome 8 contains 6 fragments from 4 different chromomes (Figure 3A). Interestingly, breakpoints 1p32, 3q25, 4q11, 8p11, 8q11, 10p14, 11q23, and 15q22 are described for the first time in MCL as breakpoints associated with structural abnormalities (Figure 2). Three of the breakpoints identified by M-FISH are localized in chromosomal regions in which known CFSs are located: 1p22 (FRA1D), 3q25 (FRA3D), and 15q22 (FRA15A). The two additional breakpoints detected only by CGH, 8q24 and in 12q21 are also associated with FRA8D and FRA12B, respectively.

Mantle Cell Lymphoma Cell Lines Share Breakpoints with MCL Cases

Ten MCL cell lines including the five cell lines previously published (Camps et al., 2006) and HBL-2, MAVER-1, MINO, UPN-1, and Z-138 were analyzed. Similarly, to MCL primary cases no common structural aberrations in addition to the t(11;14) were identified, although translocations involving chromosomes 9, 1, and 8 were frequently detected (13, 11, and 11 rearrangements, respectively) (Figure 1C). All ten cell lines have structural and numerical alterations, (except JVM-2 that presented only two structural alterations), with 111 numerical (range 0-22, 11.1 mean imbalances/cell line), and 119 structural aberrations (range 2-30, 11.7 mean imbalances/cell line). JEKO-1 was the cell line with the highest number of structural alterations (30 alterations) (Figure 1D).

We calculated the pattern of cytogenetic instability of the five cell lines not previously published. All five cell lines showed high percentages of modal number variability as JEKO-1 and NCEB-1 in our previous report (Camps et al., 2006), but heterogeneous levels of non-clonal structural variability (Supplementary Table 1).

Common breakpoints between the ten cell lines and the nineteen altered MCL patients were identified: 1p22 (JEKO-1 and REC-1), 1p32 (in JEKO-1), 8p11 and 8q11 (both in REC-1 and UPN-1), 10p14 (in MAVER-1), and 12p13 (in NCEB-1). Similarly to MCL cases, breakpoint 1p22 resulted in a partial deletion of 1p arm, whereas breakpoint 8p11 resulted in a rearrangement (Figure 3C), with both sex chromosomes rearranged with chromosome 8 in UPN-1, and 11p in REC-1.

Interestingly, MINO cell line, that was reported to be derived from a female patient, presented the previously described translocations by *Lai et al.* (Lai et al., 2002), and additionally, we detected two Y chromosomes per metaphase by M-FISH that were further validated by Y WCP FISH hybridization in most of the metaphases studied (Figure 4A-B). This cell line was established in 2002 from a 64-year-old white woman

patient diagnosed in early 1993, however its M-FISH karyotype is reported for the first time in the present study.

Complex t(11;14)(q13;q32) Translocations in MCL Cases and Cell Lines

M-FISH analysis revealed a subset of five primary tumors: M6, M9, M15, M17 and M19, and four MCL cell lines: MINO, JEKO-1, MAVER-1, and UPN-1 with complex translocation involving *IGH* and *CCND1* loci and other chromosomes as chromosomes 2 (M15 and M19), 6 (MAVER-1), 8 (M6, M9 and MINO), 10 (M17) and 17 (JEKO-1). UPN-1 showed a complex rearrangement (Figure 4C-D) involving an unidentified chromosome partner. The third implicated chromosome could not be identified by using FISH probes (WCP probes of chromosomes 8 and 19 and a dual-color dual-fusion t(11;14) probe).

Some Cases and Cell Lines do Not Express the Long Transcript of CCND1

To find a possible correlation between the presence of complex t(11;14)(q13;q32) and the lack of expression of the 3'UTR-deficient *CCND1* transcript, six cell lines and six cases were analyzed for *CCND1* transcript levels using RT-PCR. The total transcript levels of *CCND1* and the short 3'UTR-deficient transcript are listed in Supplementary Table 2. Three of the MCL cell lines, REC-1, JEKO-1 and UPN-1, exclusively express the short transcript, that lacks the 3'UTR regulatory region, and showed the highest levels of total expression. In a previous report, the evaluation of the genomic deletion of the 3'UTR region of *CCND1* as a potential reason of predominant expression of the short transcript, showed that REC-1 does not have deletion of *CCND1* 3'UTR, whereas JEKO-1 harbors a genomic deletion (Slotta-Huspenina et al., 2007). In the third cell line, UPN-1, the possible explanation for 3'UTR-deficient *CCND1* transcript expression, could be the

complex t(11;14) translocation, that affects *CCND1* gene concomitantly in its promoter (5' region, that corresponds to the classical juxtaposition of *IGH* promoter with the coding region of *CCND1*) and 3'UTR region (possibly causing deletion of 3' UTR at genomic level).

In the primary cases studied by RT-PCR for *CCND1* transcripts, we found no cases with exclusive expression of 3'UTR-deficient transcript. However, we detected two cases (M8 and M9) with relatively low levels of *CCND1* 3' UTR, both cases showed the highest total *CCND1* expression levels. Similarly to UPN-1 cell line, only in one of these two cases (M9) the complex t(11;14) with chromosome 8 could be a possible explanation for the lack of 3'UTR region.

Clinical Significance of Chromosomal Alterations in MCL

Complete follow-up data were available for 23 patients. The prognostic value of the numerical, structural and non-clonal alterations was analyzed in the entire set of MCLs. Cases with a high number (> 3 alterations) of numerical and non-clonal structural alterations showed poorer survival than cases with less alterations (≤ 3 alterations) (Median OS, 2.8 vs. 53.5 months; $P < 0.000$ and median OS, 13.1 vs. 53.5 months; $P = 0.006$, respectively). Although the sample size of the present series is reduced, we studied the prognostic value of gains of 3q and losses of 8p, 9p, and 9q identified by M-FISH and/or CGH. We observed that cases with losses of 8p and 9p had a poorer prognosis than cases without these alterations (median OS, 13.1 vs. 53.5 months; $P = 0.045$ and median OS, 7.7 vs. 53.5 months; $P < 0.0003$, respectively). We studied also the prognostic value of the recurrent breakpoints but we did not find any correlation between the presence of any breakpoint and the survival.

DISCUSSION

In this study we have characterized cytogenetically 23 MCL cases and 10 MCL cell lines by M-FISH, FISH, and CGH techniques. M-FISH enabled the identification of the different chromosomes contributing to the marker chromosomes not previously identified by conventional cytogenetics. The combination of M-FISH, FISH and CGH improved the resolution power of M-FISH, and helped in defining more precisely the breakpoints involved in different rearrangements. We have identified new chromosomal alterations and uncovered previously unidentified rearrangements and several recurrent breakpoints. Eighty-three % of the cases displayed altered karyotypes with a high number of structural, preferentially involving chromosomes 8, 10 and 1, and 11 and 14 due to the hallmark t(11;14), and numerical alterations. As expected, MCL cell lines displayed more complex karyotypes than primary tumors, with structural alterations in which chromosomes 9, 1 and 8 were the most rearranged. Remarkably, no recurrent translocations were found however, we identified several chromosomal regions and recurrent breakpoints involved in structural rearrangements. Interestingly, among cases and cell lines the most altered chromosomes were 1 and 8, particularly 1p22 and 8p11, found in 4 cases and 2 cell lines, each. Of note, structural alterations involving 1p22 preferentially led to loss of material in all cases, 1p21-p31 loss was one of the most frequently lost regions in MCL. In contrast, breakpoint 8p22 was involved preferentially in complex rearrangements, that moreover in two cases include the t(11;14). To our knowledge this is the first study in a large series of MCL by M-FISH or Spectral Karyotyping and in comparison to different studies in other B-cell malignancies, the current series of MCL displayed the highest number of alterations (Lestou et al., 2003; Karpova et al., 2006; Baro et al., 2007; Nanjangud et al., 2007) accordingly to results obtained by other techniques (Salaverria et al., 2006). By the other hand, although no

recurrent translocations were detected, several recurrent breakpoints were identified, an interestingly some of them, 1p32, 3q25, 4q11, 8p11, 8q11, 10p14, 11q23, and 15q22 have not been previously described in MCL as breakpoints associated with structural alterations. This information is new due to the fact that breakpoints detected by CGH, array-CGH and SNP arrays are not always associated with a structural rearrangement, but they can be associated with amplifications.

In a previous M-FISH study in 5 MCL cell lines (Camps et al., 2006), we calculated chromosomal instability based on modal number variability and structural non-clonal variability. We have reproduced this study in the present series of primary tumors and in five additional MCL cell lines and we observed that the levels of instability were similar in the majority of tumors and all cell lines, except JVM-2 that has no modal number and non-clonal structural variability, similarly to a group of four stable MCL cases.

We have also discovered the presence of chromosomes Y in MINO cell line that was supposed to be derived from a female patient (Lai et al., 2002). The explanation for this phenomenon could be a deletion of the Sex-determining region Y gene (*SRY*) that codifies for the testis-determining factor (TDF), which initiates male sex determination.

It has been reported that typical MCL with *ATM* inactivation showed increased number of chromosomal imbalances (Camacho et al., 2002), in the present independent series of MCL cases, the number of alterations (both structural and numerical) was also higher in the cases with *ATM* gene deletion, although it did not reach statistical significance. The number of cases studied is limited and *ATM* gene mutations have not been analyzed, but still the association with *ATM* gene inactivation and complex karyotypes is manifested.

Recent studies have identified cryptic t(11;14) in MCL using a combination of conventional cytogenetics and FISH in 18 cases (Gazzo et al., 2005) and a combination of FISH and M-FISH but only in isolated cases (Wong, 1999; Gruszka-Westwood et al.,

2002; Maravelaki et al., 2004; Gazzo et al., 2006). In our series, we also described a group of five primary tumors and four cell lines carrying complex t(11;14) translocations. The use of M-FISH has enabled the identification of the complex t(11;14) in case M9, whereas for case M6 and cell lines UPN-1 and MINO, the cryptic t(11;14) could only be detected by the combination of M-FISH and FISH. Interestingly, two cases and one cell line presented the t(11;14)(q13;q32) rearranged with chromosome 8. In addition, complex rearrangement between *CCND1* and *IGH* and chromosome 8 had been also described in one case by Gazzo et al. (Gazzo et al., 2005), so increasing evidence indicates that the arrangement of chromosomes within the cell is not random. In the interphase nuclei of mammalian and chicken cells, chromosomes are positioned none randomly in the nucleus periphery according to its density or size. Physical proximity has been suggested to facilitate chromosome translocations by favoring exchanges between proximal chromosomes compared to distally located ones (Sachs et al., 1997). In this sense, studies performed in the positioning of chromosomes have described that chromosomes 8 and 11 are found to be closely apposed, not only in most of the mitotic rosettes, but also in the interphase nuclei (Nagele et al., 1999). The formulation of these complex translocations has been done following the standard rules (ISCN 1995, 1995), although we think that the current nomenclature can not fully describe these specific alterations of MCL, emphasizing that the t(11;14)(q13;q32) is the initial phenomenon and that these complex genetic alterations are secondary events in the development of these tumors. We therefore, suggest a specific nomenclature for these complex t(11;14) translocations, as it has been developed for the isochromosome Philadelphia (ISCN 2005).

In the present study, we suggest that the expression of *CCND1* lacking the 3'UTR region can be due to truncation of *CCND1* gene generated by a chromosomal translocation at *CCND1* 3', in addition to the *CCND1* 5' t(11;14)(q13;q32) translocation in at least one

cell line and one primary tumor, postulating that, besides the t(11;14) complex rearrangement, events at *CCND1* locus are responsible for alterations in the structure of *CCND1* RNA in MCL, as it has been demonstrated for point mutations (Wiestner et al., 2007).

It is well stated that complex karyotypes are associated to an aggressive clinical course in MCL (Bea et al., 1999). In this series, although the number of cases is limited we have found correlation between high number of numerical and non-clonal alterations and poor survival. Additionally, losses of 8p and 9p detected by M-FISH and/or CGH are also associated to worse survival despite the low number of cases, these regions have already been previously associated to poor prognosis in independent series of MCL (Bea et al., 1999; Allen et al., 2002; Kohlhammer et al., 2004; Rubio-Moscardo et al., 2005; Salaverria et al., 2007).

In conclusion, the combination of M-FISH, FISH and CGH analysis offers a more specific approach to uncover the high degree of complex genetic imbalances in MCL, delineating frequent regions of gain and loss and recurrent breakpoints, but not recurrent translocations. Moreover, complex and cryptic translocations involving *IGH* and *CCND1* loci were found. These recurrent regions of gain and loss and breakpoints may target relevant genes or regions that could be pivotal in MCL pathogenesis.

TABLE 1. Karyotypes of the 19 altered MCL cases determined by M-FISH, CGH and FISH

Case	Variant	Sample	Karyotype
M1	T	PB (Cr)	46XY,del(6)(?) [2],t(2;13)(?:?) [2],t(11;14)(q13;q32) [2] [cp6]
M2*	T	PB (Cr)	30,X,-X[6],-2[5],-6[5],-7[6],-8[7],-9[6],-10[5],-11[8],t(11;14)(q13;q32) [7], del(12)(q11) [4],-13[5],-14[6],-16[5],-17[9],-18[8],-19[7],-20[10],-21[5],-22[5] [cp10]
M3*	T	LN (Cr)	46,XY,del(1)(q24) [4],der(6)t(6;8)(q15;q13) [3],der(6)t(6;15)(p22;q11) [4], +del(7)(q11) [3],der(8)t(1;8)(q24;p11) [3],t(11;14)(q13;q32) [4], -18[2],der(18)t(1;18)(q24;q23) [2],+21[2] [cp7]
M4	T	PB	46,XY,t(11;14)(q13;q32) [4] [cp7]
M5*	B	SP (Cr)	45X,-X[6],der(X)t(X;1)(q10;?) [5],der(1)t(1;2)(p32;p12) [5], der(2)t(1;2)(?:p12) [5],dup(3)(q21qter) [6],der(10)t(X;10)(p11;p14) [6], del(11)(q21q23) [4],t(11;14)(q13;q32) [5],-13[4] [cp12]
M6	T	PB (Cr)	47,XY,t(2;17)(p11;q13) [6],+3[6],t(8;11;14)(11qter→11q13::14q32::8p11→8qter; 11pter→11q13::14q32→14qter;14pter→14q32::8p11→8pter) [6], der(17)t(7;17)(p15;p13) [6],-21[3] [cp8]
M7*	B	PB	44,XY,dup(8)(?) [4],der(10)t(10;21)(p12;q11) [4], -11[4],del(11)(q22q23) [4],-21[4] [cp20] ish del(11q22.3) (ATM-)
M8	T	PB (Cr)	45,XX,t(2;13)(q13;q13) [3],-8[3],der(12)t(3;12)(q25;p13) [4], t(11;14)(q13;q32) [6],-20[2],-21[3],der(22)t(18;22)(?:p11) [2] [cp10]
M9	T	PB (Cr)	42,XY,der(3)t(3;13)(q29;q11) [3],- 8[6],t(8;11;14)(11qter→q25::8p11→8qter;11pter→11q13::14q32→14qter;14pter→14q32::11q13 →11q25::8p11→8pter) [3],-10[5],-11[5], der(16)(16pter→16q13::19?→19?::11?→11q25::8p11→8pter) [2],-21[7],-22[5] [cp7]
M10*	T	PB (Cr)	43,XY,der(10)t(8;10)(q21;q21) [2],t(11;14)(q13;q32) [2] [cp6]
M11	T	PB	46,XY,del(6)(q25) [16],-8[16],t(11;14)(q13;q32) [16],+der(12)t(8;12)(q11;p13) [16] [cp16]
M12*	T	PB (Cr)	44,XX,-1[3],del(1)(p21p22) [3],-2[3],-4[2],-6[2],der(6)t(6;13)(q22;q21) [3], der(9)t(8;9)(?:?) [2],t(11;14)(q13;q32) [4],-13[4],-16[4],-17[3],-22[5] [cp9]
M13	B	PB (Cr)	40,-X[4],-Y[12],del(1)(p22p31) [8],+der(4)t(4;17)(q11;q11) [8], der(8)t(10;8;1;8;1;5)(10pter→10p11::8p11→8q22::1?→1?::8q23→8q24::1? →1?::5?→5?) [11],der(9)t(9;14)(p13;q11) [10],-10[6], der(10)t(10;22)(q11;q11) [3],der(11)dup(11)(q14q21)ins(11;15)(q21;q22qter) [9], t(11;14)(q13;q32) [9],-14[10],-17[12],-19[6],der(19)t(19;22)(q11;q11) [7], -20[7],-22[3],-22x2[7],der(22)t(4;22)(q23;q11) [5] [cp12]
M14	T	PB (Cr)	44,XY,del(7)(q21qter) [2],-10[4],der(10)t(3;10)(?:p14) [4], t(11;14)(q13;q32) [10],der(13)t(3;10;13)(10p14→10p11::13p11→13q22::3q25→3qter) [9], der(19)t(15;19)(q22;q11) [5] [cp10]

M14-2	T	PB (Cr)	45,XY,-10[3],der(10)t(3;10)(?:p14)[4],t(11;14)(q13;q32)[8], der(13)t(3;10;13)(10?→10?:13p11→13q22::3q25→3qter)[8],der(19)t(15;19)(q22;q11)[8][cp8]
M15	B	BM	46,XY,del(1)(p22p32)[14],dup(3)(q11qter)[14], der(15)t(15;21)(q10;q11)[2],t(2;11;14)(p21;q13;q32)[14][cp14]
M16	B	PB	46,XX,t(11;12;15)(q13;q23;q22)[10],t(11;14)(q13;q32)[8][cp16]
M17*	B	BM	44,XY,t(1;1)(p22;p36)[4],-10[4],del(11)(q21q23)[4], der(11)t(11;14)(q13;q32)[4], -13[4],i(13)(q10)[4],der(13)t(3;11;13)(3?→3?:11q13→11q24::13q14→13qter)[4], der(14)t(10;11;14)(10pter→310p11::14p11→14q32::11q13→11qter)[4],-16[4][cp7] ish del(11q22.3) (ATM-)
M18	T	PB	46,XX,t(11;14)(q13;q32)[2][cp11]
M19*	T	BM	46,X,-X[4],t(2;11;14)(2pter→2q?:14p11→14q32::11q13→qter)[5],-4[5],del(4)(q?)[4], t(4;14;20)(q11;q11;p13)[2],t(11;14)(q13;q32)[4],-12[2],-21[3],-22[3][cp25] ish del(11q22.3) (ATM-)

* Cases with *ATM* gene deletion detected by RQ-PCR and/or FISH (*LSI ATM*); T: typical variant; B: blastoid variant; PB: peripheral blood; Cr: cryopreserved cells; LN: lymph node; SPL: spleen; BM: bone marrow; cp: composite karyotype. Karyotypes were determined by M-FISH, LSI probes, WCP and breakpoints were strictly revised with CGH data.

TABLE 2. Karyotypes of 5 MCL-derived cell lines determined by M-FISH, CGH and FISH

Cell line	Karyotype
HBL-2	41,X-Y[5],der(1)t(1;3)(q22;q13.3)[7],der(1)t(1;3)(q22;q13.3)[3],-3[3],der(3)t(3;15)(q13.3;q11)[2], der(4)t(1;4)(q11;p11)[9],der(6)t(6;11)(q23;p11)[10],der(9)t(3;9)(q13.3;p21)[10],+11[4], der(11)t(8;11)(q21.3;q11)[5],-12[5],-13[8],der(14)t(11;14)(q13;q32)[14], der(14)t(14;15)(q32;q11)[9],-15[5],-16[4],del(17)(p12)[7],der(18)t(4;18)(p11;q12)[6], +der(18)t(4;18)(p11;q12)[3],-19[4],-21[5],-22[4],der(22)t(9;22)(q31;q11)[6][cp14]
MAVER-1	38,XY,+der(X)del(X)(q?) [5],der(1)t(1;3)(p36;q22)[9],-3[10], der(6)t(6;der(14)t(11;14)(q14;?)[10],-8[10],der(9)t(3;9;22)(22qter→22q11::9p24→q34::3?→3?)[9], der(10)t(8;10)(q21;p15)[9],i(12)(q10)[10],-13[8],dup(15)(q25qter)[8], der(17)t(2;8;17)(8?→8?::17p13→17q25::2?→2?)[7],der(21)t(13;21)(q22;p11)[7],-22[8][cp11]
MINO	73,X,-X[12],+Yx2[8],+2[4],del(3)(q21)[4],-3[12],del(5)(p11)[9],del(6)(q21)[8],-6[6],+7x2[5],-8[5], t(8;11;14)(8pter→q24::14q32→14q32::11q13→11qter;11pter→11q13::14q32→qter;14pter→14q32)[5], t(8;11;14)(8pter→q24::14q32→14q32::11q13→11qter;11pter→11q13::14q32→qter;14pter→14q32)x2[7], -9[6],der(11)t(11;14)(q24;q23)[7],-11[8],-12[5],der(13)t(3;13)(q21;q33)[3], der(13)t(3;13)(q21;q33)x2[2],del(14)(q23)[6],-14[5],-14x2[4],-15[4],-16[4],-18[6],+20[5],+22[4][cp12] ish Y(wcp Y++)
UPN-1	42,X,-Y[14],del(2)(q11)[7],del(2)(q11)x2[2],der(4)t(4;8)(q33;?)[11],-6[3],-8[14], der(8)t(X;Y;8)(q25;?;p11)[12],der(9)del(9)(p11)del(9)(q21)[8],+der(9)del(9)(p11)del(9)(q21)x2[2], der(11)t(11;13)(q13;q14)[11],-12[4],i(13)(q10)[10],i(13)(q10)x2[2],-16[12], der(16)t(9;16)(q21;p11)[12],der(17)t(2;17)(q11;p13)[13],del(18q11)[9],der(18)t(16;18)(?;p11)[9], -19[6],der(19)t(11;19)(q13;?)[11],der(21)t(2;8;21)(2?→2?::8?→8?::21p11→21qter)[12], der(22)t(8;22)(q11;p13)[8][cp14] ish t(11;14)(q13;q32)(CCND1-, IGH+, CCND1+),+der(11)t(11;14)(q13;q32)(IGH+,CCND1+) ish der(19)t(11;19)(p13;?)(wcp 19+)
Z-138	43,X,-Y[4],-2[6],-4[4],+7[5],-10[6],t(11;14)(q13;q32)[11],+13[4], der(15)t(1;15)(q22;p11)[11],-16[5],-17[6],+18[4][cp12] ish Y(wcp Yx1)

Karyotypes were determined by M-FISH, LSI probes, WCP probes and breakpoints were strictly revised with CGH data.

SUPPLEMENTARY TABLE 1. Cytogenetic variability in
MCL cell lines and primary tumors

Case/ cell line	Mn/ Ploidy	Mn variability ^a	Non-clonal structural variability ^b
M1	46/2n	33.33	0.33
M2	30/n+	80.00	0.20
M3	46/2n	57.14	1.29
M4	44/2n-	0	0
M5	45/2n-	33.33	0.25
M6	47/2n+	37.50	0.25
M7	44/2n-	10.00	0.00
M8	45/2n-	70.00	0.20
M9	42/2n-	71.43	2.57
M10	43/2n-	66.67	0.83
M11	46/2n	31.25	0.06
M12	44/2n-	77.78	1.22
M13	40/2n-	66.67	1.17
M14	44/2n-	50.00	0.30
M15	46/2n	37.50	0.13
M16	44/2n-	14.29	0
M17	44/2n-	18.75	0.06
M18	46/2n	71.43	0.57
M19	46/2n	90.91	0.82
JVM-2	46/2n	0	0
GRANTA-519	42/2n-	41.6	0.25
REC-1	35/2n-	66.6	0.83
JEKO-1	76/3n+	54.5	0.45
NCEB-1	87/4n-	73.3	0.27
HBL-2	41/2n-	85.71	0.92
MAVER-1	38/2n-	72.73	0.18
MINO	73/3n+	83.33	0.08
UPN-1	42/2n-	71.43	0.43
Z-138	43/2n-	83.33	0

Mn: modal number;

^a Percentage of metaphases in which the chromosome number is different from the modal number;

^b Number of non-clonal structural rearrangements per cell.

SUPPLEMENTARY TABLE 2. CCND1 expression in MCL cases and cell lines

Sample	Complex translocation	CCND1 Total expression ^a	Expression of short 3'UTR deficient transcript ^b
HBL-2	No	2.4	4.5
REC-1 [#]	No	27	0
MAVER-1	Yes	4.2	3.4
MINO	Yes	0.8	5.7
UPN-1*	Yes	8.7	0
JEKO-1 [¶]	Yes	13.3	0
M5	No	1.5	3.0
M6	Yes	2.5	1.7
M8	No	2.8	0.9
M9*	Yes	4.7	0.85
M10	No	1.1	5.0
M15	Yes	0.5	4.8

*Possible lack of expression of CCND1 due to complex translocation t(11;14)

[¶]deletion of the 3' UTR and [#] no deletion of the 3'UTR (Slotta-Huspenina et al., 2007)

^a CCND1/TBP: relative total CCND1 expression levels

^b Short 3'UTR deficient transcript levels relative to KMS 12 expression (KMS 12 cell line preferentially expresses CCND1 transcript with a conserved 3'UTR)

Figure legends

Figure 1: (A) Bar diagrams comparing number of rearrangements and number of derivative chromosomes in MCL primary cases. (B) Bar diagrams of number of numerical and structural alterations observed by M-FISH in MCL cases. (C) Bar diagrams comparing number of rearrangements and number of derivative chromosomes in MCL cell lines. (D) Bar diagrams of number of numerical and structural alterations observed by M-FISH in MCL cell lines.

Figure 2: Ideogram of MCL cases showing the minimal common regions detected by CGH (green and red bars correspond to minimal gains and losses, respectively) and the incidence of recurrent breakpoints (asterisks). In green letters recurrent breakpoints observed only by CGH and in red, recurrent breakpoints described for the first time in MCL.

Figure 3: (A) Representative partial karyotypes of MCL cases displaying translocations involving the 8p11 locus, cases M6 and M9 presented the complex $t(11;14)(q13;q32)$; in chromosome 8; (B) Identification of the cryptic $t(11;14)(q13;q32)$ in case M6 using the combination of FISH probes (CEP 8 and dual-color dual-fusion $t(11;14)$); (C) Representative partial karyotypes of REC-1 and UPN-1 cell lines displaying translocations involving 8p11 breakpoint.

Figure 4: (A) A representative metaphase of MINO cell line by M-FISH showing a triploid karyotype with a cryptic $t(11;14)(q13;q32)$ (yellow arrow) and two Y chromosomes (green arrow); (B) FISH using WCP Y probe of MINO cell line validating the identification of two Y chromosomes; (C and D) Detection of the cryptic $t(11;14)(q13;q32)$ in UPN-1 cell line using M-FISH (C) and dual-color dual fusion FISH

probe for the t(11;14) (D) over the same metaphase. Yellow arrow points to fusion signal of the *CCND1/IGH* on the derivative chromosome 14.

Acknowledgments

Thanks to Lurdes Zamora for providing samples and to Laura Plà and Candida Gómez for their excellence technical assistance.

REFERENCES

- Allen JE, Hough RE, Goepel JR, Bottomley S, Wilson GA, Alcock HE, Baird M, Lorigan PC, Vandenberghe EA, Hancock BW, & Hammond DW 2002. Identification of novel regions of amplification and deletion within mantle cell lymphoma DNA by comparative genomic hybridization. *Br J Haematol* 116: 291-298.
- Baro C, Salido M, Espinet B, Astier L, Domingo A, Granada I, Milla F, Carrio A, Costa D, Luno E, Hernandez JM, Campo E, Florensa L, Ferrer A, Salar A, Bellosillo B, Besses C, Serrano S, & Sole F 2007. New chromosomal alterations in a series of 23 splenic marginal zone lymphoma patients revealed by Spectral Karyotyping (SKY). *Leuk Res*.
- Bea S, Ribas M, Hernandez JM, Bosch F, Pinyol M, Hernandez L, Garcia JL, Flores T, Gonzalez M, Lopez-Guillermo A, Piris MA, Cardesa A, Montserrat E, Miro R, & Campo E 1999. Increased number of chromosomal imbalances and high-level DNA amplifications in mantle cell lymphoma are associated with blastoid variants. *Blood* 93: 4365-4374.
- Bentz M, Plesch A, Bullinger L, Stilgenbauer S, Ott G, Muller-Hermelink HK, Baudis M, Barth TF, Moller P, Lichter P, & Dohner H 2000. t(11;14)-positive mantle cell lymphomas exhibit complex karyotypes and share similarities with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 27: 285-294.
- Bosga-Bouwer AG, Hendriks D, Vellenga E, Zorgdrager H, & van den Berg E 2001. Cytogenetic analysis of cryopreserved bone marrow cells. *Cancer Genet Cytogenet* 124: 165-168.
- Camacho E, Hernandez L, Hernandez S, Tort F, Bellosillo B, Bea S, Bosch F, Montserrat E, Cardesa A, Fernandez PL, & Campo E 2002. ATM gene inactivation in mantle cell lymphoma mainly occurs by truncating mutations and missense mutations involving the phosphatidylinositol-3 kinase domain and is associated with increasing numbers of chromosomal imbalances. *Blood* 99: 238-244.
- Camps J, Salaverria I, Garcia MJ, Prat E, Bea S, Pole JC, Hernandez L, Del Rey J, Cigudosa JC, Bernues M, Caldas C, Colomer D, Miro R, & Campo E 2006. Genomic imbalances and patterns of karyotypic variability in mantle-cell lymphoma cell lines. *Leuk Res* 30: 923-934.
- Cuneo A, Bigoni R, Rigolin GM, Roberti MG, Bardi A, Piva N, Milani R, Bullrich F, Veronese ML, Croce C, Birg F, Dohner H, Hagemeijer A, & Castoldi G 1999. Cytogenetic profile of lymphoma of follicle mantle lineage: correlation with clinicobiologic features. *Blood* 93: 1372-1380.
- Durkin SG & Glover TW 2007. Chromosome Fragile Sites. *Annu.Rev.Genet.* (in press).
- Espinet B, Sole F, Woessner S, Bosch F, Florensa L, Campo E, Costa D, Lloveras E, Vila RM, Besses C, Montserrat E, & Sans-Sabrafen J 1999. Translocation (11;14)(q13;q32) and preferential involvement of chromosomes 1, 2, 9, 13, and 17 in mantle cell lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet* 111: 92-98.
- Gazzo S, de Colella JM, & Callet-Bauchu E 2006. Sequential fluorescence in situ hybridisation analysis for cryptic t(11;14)(q13;q32) in mantle cell lymphoma. *Br J Haematol* 134: 452.
- Gazzo S, Felman P, Berger F, Salles G, Magaud JP, & Callet-Bauchu E 2005. Atypical cytogenetic presentation of t(11;14) in mantle cell lymphoma. *Haematologica* 90: 1708-1709.
- Gruszka-Westwood AM, Atkinson S, Summersgill BM, Shipley J, Elnenaei MO, Jain P, Hamoudi RA, Kaeda JS, Wotherspoon AC, Matutes E, & Catovsky D 2002. Unusual case of leukemic mantle cell lymphoma with amplified CCND1/IGH fusion gene. *Genes Chromosomes Cancer* 33: 206-212.
- ISCN. 1995 *An International System for Human Cytogenetic nomenclature*, (1995) Basel: S. Karger AG.

- ISCN.2005 *ISCN (2005) An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*, (2005), Basel: Karger AG.
- Jares P, Colomer D, & Campo E 2007. Genetic and molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: perspectives for new targeted therapeutics. *Nat Rev Cancer* 7: 750-762.
- Jarsova M, Papajik T, Holzerova M, Dusek L, Pikalova Z, Lakoma I, Raida L, Faber E, Divoka M, Vlachova S, Prekopova I, Novosadova A, Pospisilova H, & Indrak K 2004. High incidence of unbalanced chromosomal changes in mantle cell lymphoma detected by comparative genomic hybridization. *Leuk Lymphoma* 45: 1835-1846.
- Karpova MB, Schoumans J, Blennow E, Ernberg I, Henter JI, Smirnov AF, Nordenskjold M, & Fadeel B 2006. Combined spectral karyotyping, comparative genomic hybridization, and in vitro apoptotyping of a panel of Burkitt's lymphoma-derived B cell lines reveals an unexpected complexity of chromosomal aberrations and a recurrence of specific abnormalities in chemoresistant cell lines. *Int J Oncol* 28: 605-617.
- Kohlhammer H, Schwaenen C, Wessendorf S, Holzmann K, Kestler HA, Kienle D, Barth TF, Moller P, Ott G, Kalla J, Radlwimmer B, Pscherer A, Stilgenbauer S, Dohner H, Lichter P, & Bentz M 2004. Genomic DNA-chip hybridization in t(11;14)-positive mantle cell lymphomas shows a high frequency of aberrations and allows a refined characterization of consensus regions. *Blood* 104: 795-801.
- Lai R, McDonnell TJ, O'Connor SL, Medeiros LJ, Oudat R, Keating M, Morgan MB, Curiel TJ, & Ford RJ 2002. Establishment and characterization of a new mantle cell lymphoma cell line, Mino. *Leuk Res* 26: 849-855.
- Lestou VS, Gascoyne RD, Sehn L, Ludkovski O, Chhanabhai M, Klasa RJ, Husson H, Freedman AS, Connors JM, & Horsman DE 2003. Multicolour fluorescence in situ hybridization analysis of t(14;18)-positive follicular lymphoma and correlation with gene expression data and clinical outcome. *Br J Haematol* 122: 745-759.
- Lovec H, Grzeschiczek A, Kowalski M-B, & Moroy T 1994. Cyclin D1/bcl-1 cooperates with myc genes in the generation of B- cell lymphomas in transgenic mice. *EMBO J* 13: 3487-3495.
- Maravelaki S, Burford A, Wotherspoon A, Joshi R, Matutes E, Catovsky D, & Brito-Babapulle V 2004. Molecular cytogenetic study of a mantle cell lymphoma with a complex translocation involving the CCND1 (11q13) region. *Cancer Genet Cytogenet* 154: 67-71.
- Martinez-Climent JA, Vizcarra E, Sanchez D, Blesa D, Marugan I, Benet I, Sole F, Rubio-Moscardo F, Terol MJ, Climent J, Sarsotti E, Tormo M, Andreu E, Salido M, Ruiz MA, Prosper F, Siebert R, Dyer MJ, & Garcia-Conde J 2001. Loss of a novel tumor suppressor gene locus at chromosome 8p is associated with leukemic mantle cell lymphoma. *Blood* 98: 3479-3482.
- McConnell TS, Cordova LM, Baczek NA, Foucar K, & Dewald GW 1990. Chromosome analysis of cryopreserved cells. *Cancer Genet Cytogenet* 45: 179-191.
- Monni O, Oinonen R, Elonen E, Franssila K, Teerenhovi L, Joensuu H, & Knuutila S 1998. Gain of 3q and deletion of 11q22 are frequent aberrations in mantle cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 21: 298-307.
- Nagele RG, Freeman T, McMorro L, Thomson Z, Kitson-Wind K, & Lee H 1999. Chromosomes exhibit preferential positioning in nuclei of quiescent human cells. *J Cell Sci* 112 (Pt 4): 525-535.
- Nanjangud G, Rao PH, Teruya-Feldstein J, Donnelly G, Qin J, Mehra S, Jhanwar SC, Zelenetz AD, & Chaganti RS 2007. Molecular cytogenetic analysis of follicular lymphoma (FL) provides detailed characterization of chromosomal instability associated with the t(14;18)(q32;q21) positive and negative subsets and histologic progression. *Cytogenet Genome Res* 118: 337-344.

- Rimokh R, Berger F, Delsol G, Digonnet I, Rouault JP, Tigaud JD, Gadoux M, Coiffier B, Bryon PA, & Magaud P 1994. Detection of the chromosomal translocation t(11;14) by polymerase chain reaction in mantle cell lymphomas. *Blood* 83: 1871-1875.
- Rinaldi A, Kwee I, Taborelli M, Largo C, Uccella S, Martin V, Poretti G, Gaidano G, Calabrese G, Martinelli G, Baldini L, Pruneri G, Capella C, Zucca E, Cotter FE, Cigudosa JC, Catapano CV, Tibiletti MG, & Bertoni F 2006. Genomic and expression profiling identifies the B-cell associated tyrosine kinase Syk as a possible therapeutic target in mantle cell lymphoma. *Br J Haematol* 132: 303-316.
- Rubio-Moscardo F, Climent J, Siebert R, Piris MA, Martin-Subero JI, Nielander I, Garcia-Conde J, Dyer MJ, Terol MJ, Pinkel D, & Martinez-Climent JA 2005. Mantle-cell lymphoma genotypes identified with CGH to BAC microarrays define a leukemic subgroup of disease and predict patient outcome. *Blood* 105: 4445-4454.
- Sachs RK, Chen AM, & Brenner DJ 1997. Review: proximity effects in the production of chromosome aberrations by ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 71: 1-19.
- Salaverria I, Bea S, Lopez-Guillermo A, Lespinet V, Pinyol M, Burkhardt B, Lamant L, Zettl A, Horsman DE, Gascoyne RD, Ott G, Siebert R, Delsol G, & Campo E 2008. Genomic Profiling reveals different genetic aberration in systemic ALK-positive and ALK-negative Anaplastic Large Cell Lymphomas . *Br J Haematol*. (in press).
- Salaverria I, Perez-Galan P, Colomer D, & Campo E 2006. Mantle cell lymphoma: from pathology and molecular pathogenesis to new therapeutic perspectives. *Haematologica* 91: 11-16.
- Salaverria I, Zettl A, Bea S, Moreno V, Valls J, Hartmann E, Ott G, Wright G, Lopez-Guillermo A, Chan WC, Weisenburger DD, Gascoyne RD, Grogan TM, Delabie J, Jaffe ES, Montserrat E, Muller-Hermelink HK, Staudt LM, Rosenwald A, & Campo E 2007. Specific secondary genetic alterations in mantle cell lymphoma provide prognostic information independent of the gene expression-based proliferation signature. *J Clin Oncol* 25: 1216-1222.
- Schaffner C, Idler I, Stilgenbauer S, Dohner H, & Lichter P 2000. Mantle cell lymphoma is characterized by inactivation of the ATM gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 2773-2778.
- Schraders M, Pfundt R, Straatman HM, Janssen IM, van Kessel AG, Schoenmakers EF, van Krieken JH, & Groenen PJ 2005. Novel chromosomal imbalances in mantle cell lymphoma detected by genome-wide array-based comparative genomic hybridization. *Blood* 105: 1686-1693.
- Seto M, Yamamoto K, Iida S, Akao Y, Utsumi KR, Kubonishi I, Miyoshi I, Ohtsuki T, Yawata Y, Namba M, & . 1992. Gene rearrangement and overexpression of PRAD1 in lymphoid malignancy with t(11;14)(q13;q32) translocation. *Oncogene* 7: 1401-1406.
- Slotta-Huspenina J, Koch I, Richter M, Bink K, Kremer M, Specht K, Krugmann J, Quintanilla-Martinez L, & Fend F 2007. Cyclin D1 positive multiple myeloma: Predominance of the short, 3'UTR-deficient transcript is associated with high cyclin D1 mRNA levels in cases with t(11;14) translocation, but does not correlate with proliferation rate or genomic deletions. *Leuk.Res.* (in press).
- Speicher MR, Gwyn BS, & Ward DC 1996. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* 12: 368-375.
- Tagawa H, Karnan S, Suzuki R, Matsuo K, Zhang X, Ota A, Morishima Y, Nakamura S, & Seto M 2005. Genome-wide array-based CGH for mantle cell lymphoma: identification of homozygous deletions of the proapoptotic gene BIM. *Oncogene* 24: 1348-1358.
- Wiestner A, Tehrani M, Chiorazzi M, Wright G, Gibellini F, Nakayama K, Liu H, Rosenwald A, Muller-Hermelink HK, Ott G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Vose J, Armitage JO, Gascoyne RD, Connors JM, Campo E, Montserrat E, Bosch F, Smeland EB, Kvaloy S, Holte H, Delabie J, Fisher RI, Grogan TM, Miller TP, Wilson WH, Jaffe ES, & Staudt LM 2007. Point

mutations and genomic deletions in CCND1 create stable truncated cyclin D1 mRNAs that are associated with increased proliferation rate and shorter survival. *Blood* 109: 4599-4606.

Wlodarska I, Pittaluga S, Hagemeijer A, Wolf-Peeters C, & Van Den Berghe H. 1999. Secondary chromosome changes in mantle cell lymphoma. *Haematologica* 84: 594-599.

Wong KF 1999. 11q13 is a cytogenetically promiscuous site in hematologic malignancies. *Cancer Genet Cytogenet* 113: 93-95.

Zhu Y, Monni O, Franssila K, Elonen E, Vilpo J, Joensuu H, & Knuutila S 2000. Deletions at 11q23 in different lymphoma subtypes. *Haematologica* 85: 908-912.

Figure 1

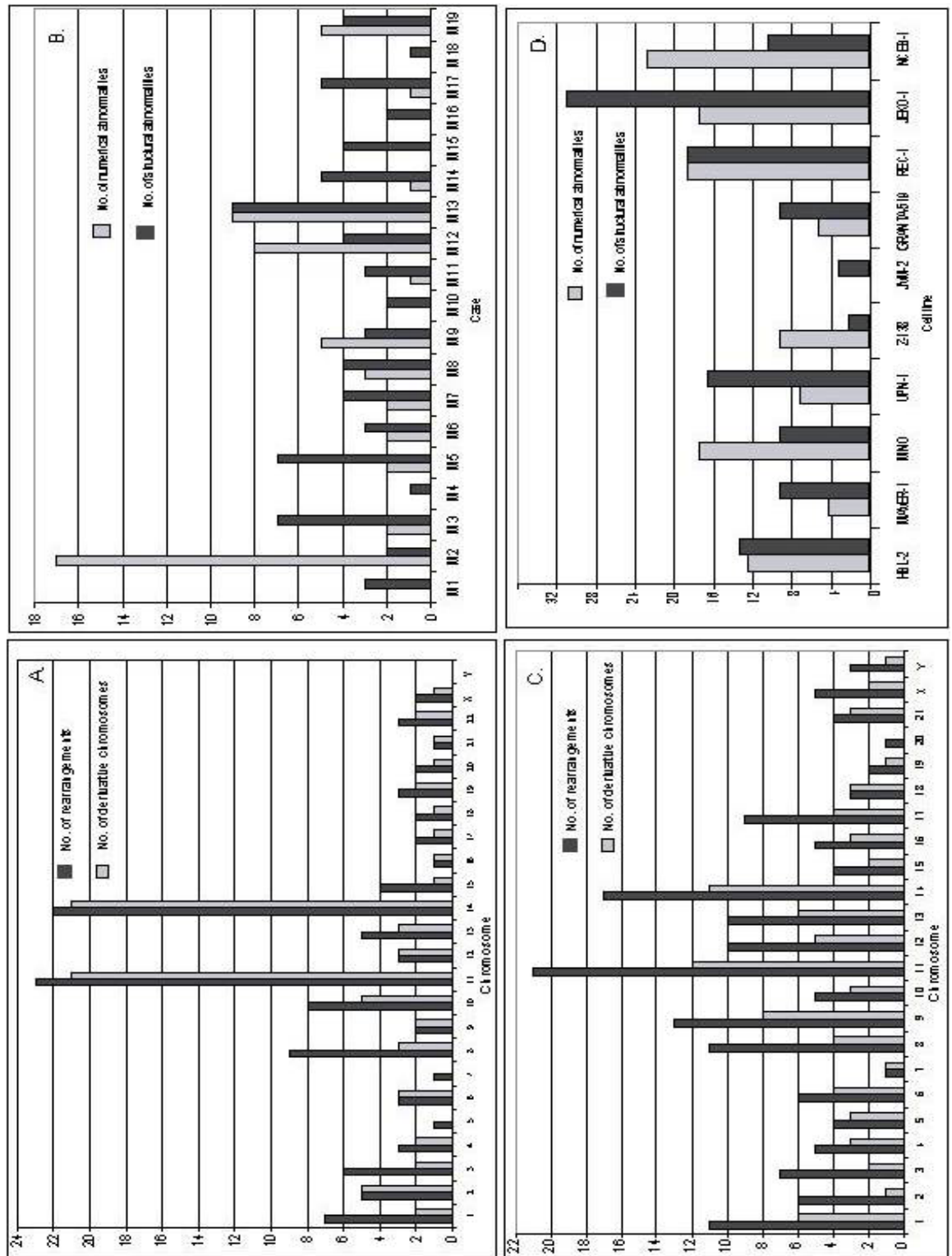


Figure 2

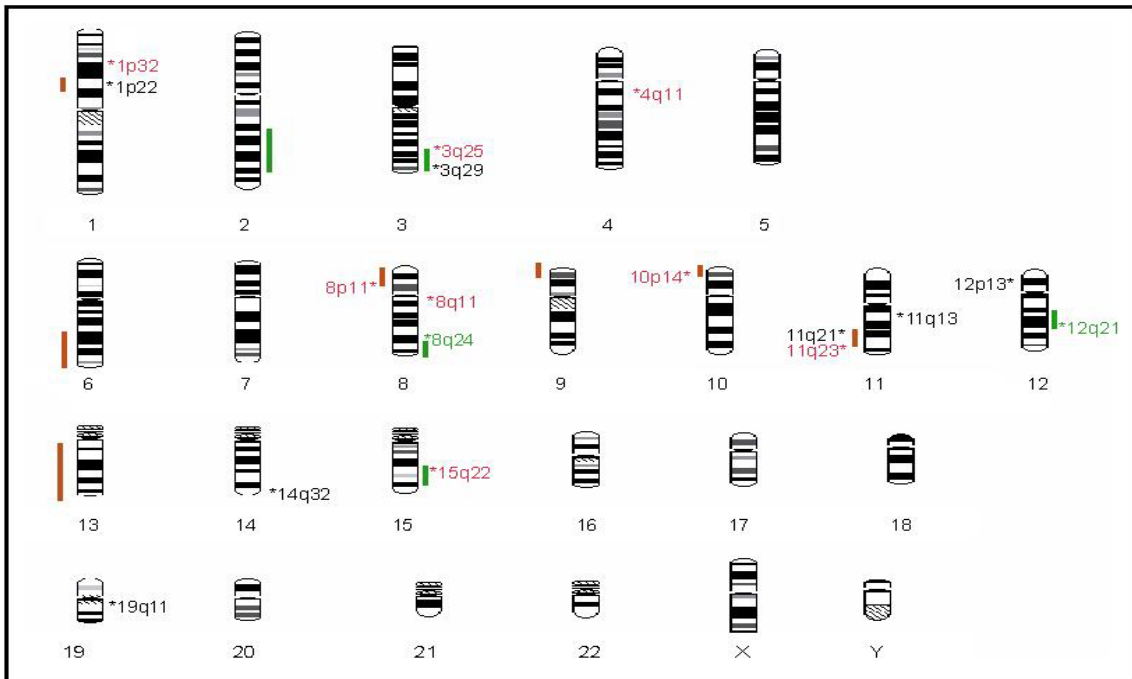


Figure 3

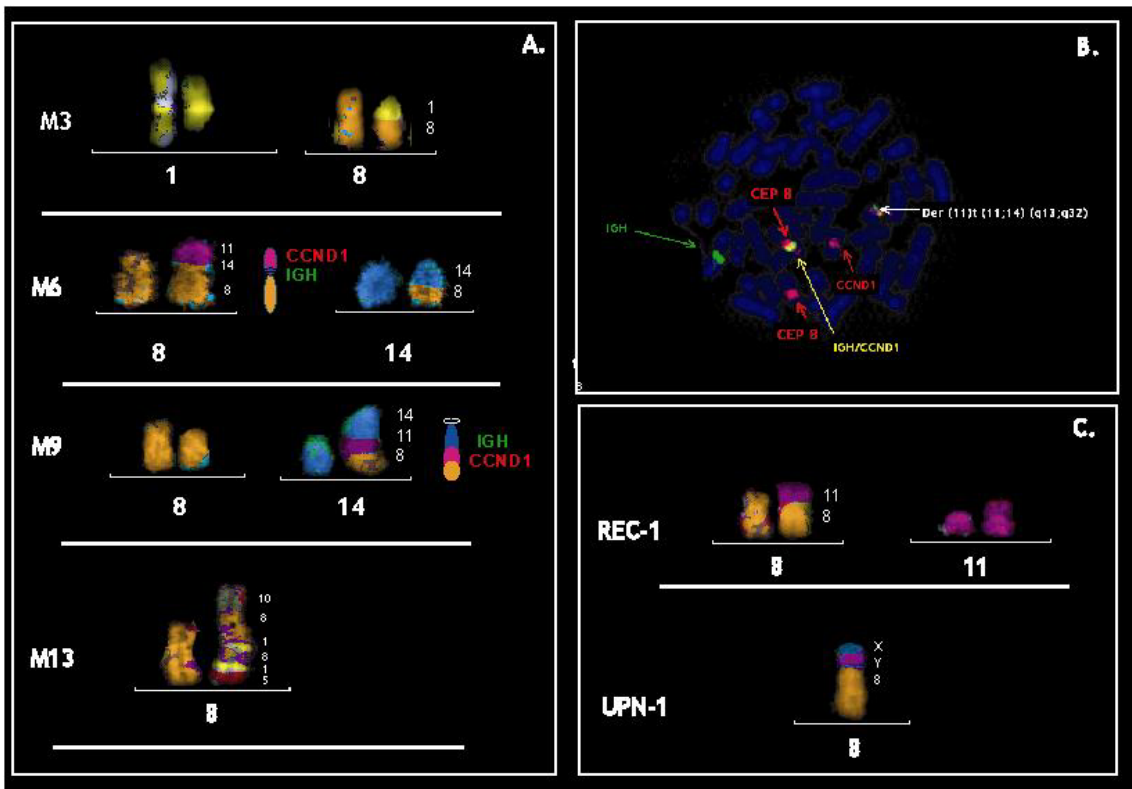
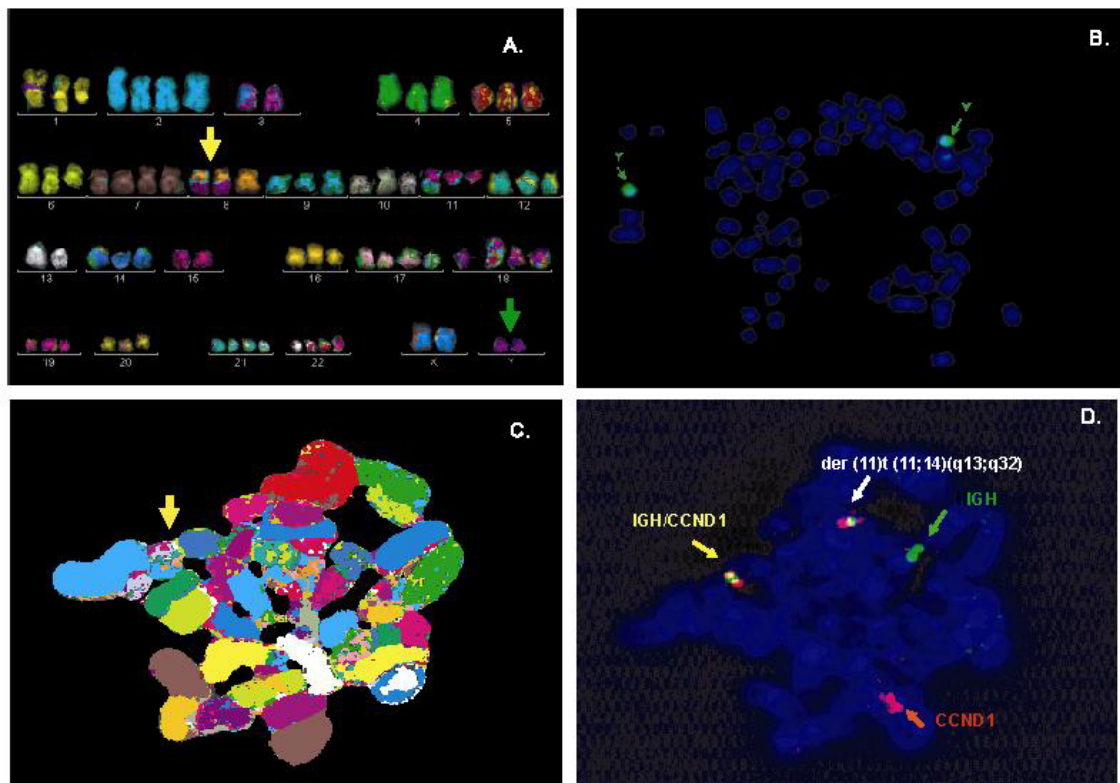


Figure 4



DISCUSSIÓ

Els resultats presentats en aquesta tesi permeten aprofundir en el coneixement de la genètica del limfoma de cèl·lules del mantell (MCL). En el primer i l'últim treball d'aquesta tesi la combinació de diferents tècniques citogenètiques com són la CGH, CGH array, M-FISH i FISH ha permès acurar en la descripció de les alteracions secundàries que caracteritzen tant aquest tipus de limfoma com de les línies cel·lulars derivades de MCL, delimitant les regions mínimes de guany i pèrdua i de trencament cromosòmic i així acurar les regions cromosòmiques que poden contenir TSGs i oncogens. Per altra banda la correlació entre les dades genètiques, les dades clíniques i les dades d'expressió han permès identificar alteracions genètiques amb valor pronòstic i veure quins gens presenten alteracions en l'expressió en funció dels guanys o pèrdues de la regió on està localitzat.

Les anomalies cromosòmiques en neoplàsies hematològiques són una font important per a la identificació de gens que tenen un paper crític en càncer, per tant les línies cel·lulars són una font molt valuosa per aquest tipus d'investigacions. És per això que en el primer treball d'aquesta tesi hem caracteritzat citogenètica i molecularment cinc línies cel·lulars de MCL (JVM-2, GRANTA-519, NCEB-1, JEKO-1 i REC-1) utilitzant M-FISH, CGH i CGH array. Els resultats de CGH array van delimitar de forma més precisa els guanys i pèrdues detectats per CGH, mentre que el M-FISH va permetre la identificació dels cromosomes marcadors no identificats mitjançant CC. Les alteracions cromosòmiques observades en aquestes cinc línies cel·lulars estan en concordància amb estudis previs en tumors primaris. (Wlodarska et al., 1999; Monni et al., 1998; Bea et al., 1999; Bentz et al., 2000; Allen et al., 2002; Martinez-Climent et al., 2001; de Leeuw et al., 2004; Tagawa et al., 2005; Rubio-Moscardo et al., 2005) Només els guanys de 2p14, 13q14-q21.2 i 13q14.34, i pèrdues a 17q21.2-q22.2 estan restringits a aquestes línies cel·lulars i no s'havien detectat en sèries prèvies de MCL mitjançant CGH o CGH array. S'han identificat nous punts de trencament localitzats a 1p31.1, 9q22, 13q13, 15q21-q22, 17q11 i 17q21.2 i regions mínimes no prèviament identificades, com els guanys de 13q34-qter i les pèrdues de 11q23.3-qter i 17q21.2-q22.2. També s'han identificat punts de trencament implicats en translocacions equilibrades a 1q32, 4p16, 5p11, 5p14, 6q25, 9p23, 9q34, 10p11 i Xq22, mitjançant M-FISH. La majoria de discontinuïtats detectades per CGH array es van confirmar mitjançant M-FISH, excepte les localitzades a 8q23.2, 8q24.22, 8q24.3, 11p13, 11p15.5, 11q21, 11q23.3, 12p12,

12q12, 13q13.3, 13q22, 13q33, 17q21.2, 17q22, 17q23.2, 18q22.1, probablement generades per petites duplicacions i delecions intersticials no detectables per M-FISH.

També hem identificat una sèrie de patrons de variabilitat *in vitro* en funció de les alteracions cromosòmiques, com ja s'ha descrit en diversos tumors sòlids.(Albertson et al., 2003) Per una banda, la línia cel·lular JVM-2 presenta un cariotip estable; GRANTA-519, NCEB-1 i JEKO-1 presenten en canvi, certa inestabilitat numèrica però no mostren un nombre elevat d'alteracions estructurals. GRANTA-519 presenta heterogeneïtat numèrica amb prevalència d'un sol clon, mentre que NCEB-1 i JEKO-1 mostren cariotips propers a la tetraploidia i a la triploidia, respectivament. Les cèl·lules cancerígenes tenen diferents maneres d'esdevenir tetraploides ja sigui per un arrest mitòtic, per una citocinesi anòmala, per defectes del fus mitòtic, o bé per fenòmens d'endoreduplicació, sent les metafases endoreduplicades aquelles que presenten quatre cromàtides de cada cromosoma. Nosaltres considerem també, com una evidència d'un fenomen d'endoreduplicació, la presència de cromosomes marcadors duplicats i la manca d'un elevat grau d'aneuploidia. Aquestes característiques s'observen en aquestes dues línies cel·lulars, NCEB-1 i JEKO-1, suggerint que l'endoreduplicació podria ser el fenomen més probable per a justificar el seu canvi de ploidia.

Finalment hem vist que REC-1 presenta un cariotip inestable amb un elevat nombre d'alteracions tant numèriques com estructurals. L'elevat grau d'alteracions no-clonals és la raó per la qual aquesta línia es considera que té un elevat grau d'heterogeneïtat estructural.

La freqüent inactivació dels gens $P16^{INK4a}$ i $TP53$ és un fenomen conegut en MCL, particularment en les variants blastoides,(Greiner et al., 1996;Hernandez et al., 1996;Dreyling et al., 1997;Pinyol et al., 1997) trobant-se les mutacions de $TP53$ majoritàriament en tumors amb $P16^{INK4a}$ no alterat.(Pinyol et al., 2000;Gronbaek et al., 2000) En l'estudi amb línies cel·lulars de MCL hem vist que aquestes mostren un patró d'inactivació d'aquests gens alternatiu, donat que les mutacions de $TP53$ es troben a les línies JEKO-1 i NCEB-1 les quals no tenen alteracions del locus $P16^{INK4a}$, mentre que les línies GRANTA-519 i REC-1, presenten delecions homozigotes de $P16^{INK4a}$ i el gen $TP53$ sense alteracions. És interessant el fet d'haver trobat dues línies cel·lulars que presenten alteracions de $TP53$ i alhora presenten alteracions de la seva ploidia donat que això suggereix que les alteracions d'aquest gen podrien estar facilitant el desenvolupament d'aquest fenotip.

Finalment, en aquest primer treball, també hem descobert un fenomen curiós a la línia cel·lular NCEB-1. Hem trobat cromosomes de ratolí, els quals probablement provenen de la fusió de les cèl·lules de la línia amb els fibroblasts de ratolí que es van utilitzar per aconseguir la proliferació cel·lular *in vitro*, en el moment de l'establiment de la línia donat que s'ha observat la seva presència en estocs independents que apunten a un origen comú de la contaminació en el seu laboratori d'origen (Drexler & MacLeod, 2006). El manteniment d'aquests cromosomes murins en tots els estocs de la línia des de el seu establiment fins a l'actualitat, suggereix que aquesta línia cel·lular tolera aquesta situació genòmica de inestabilitat i que possiblement, aquests cromosomes poden haver facilitat la seva immortalització.

Un cop realitzada aquesta caracterització de línies cel·lulars de MCL i donat que el nostre grup de recerca està dins del consorci internacional *Leukemia/Lymphoma Molecular Profiling Project* (LLMPP) vam pensar de realitzar un estudi d'una sèrie llarga de MCL de casos que provenen de diferents institucions del consorci, no prèviament analitzats en cap sèrie anterior del nostre grup.

D'aquesta sèrie que constava de 77 casos no només teníem les dades clíniques sinó que havien estat ja caracteritzats segons el seu perfil d'expressió mitjançant la plataforma *Lymphochip*. Aquest estudi d'expressió anterior havia ja identificat la presència de sis casos que malgrat presentar les mateixes característiques clíniques, morfològiques i fenotípiques i el mateix perfil d'expressió que els MCL convencionals, no expressaven CCND1 (Rosenwald et al., 2003b; Fu et al., 2005). Aquests sis casos han estat anomenats MCL CCND1-negatius i sembla ser que presenten sobre-expressió de CCND2 i CCND3 suggerint que aquesta sobre-expressió podria ser un mecanisme alternatiu en MCL. Per tant la nostra sèrie constava de 71 casos CCND1-positius i 6 negatius. Nosaltres en realitzar la caracterització citogenètica d'aquests casos mitjançant CGH, hem demostrat que aquests dos subgrups comparteixen també les mateixes alteracions secundàries essent les alteracions secundàries recurrents dels CCND1-negatius els guanys de 3q, 8q i 15q i les pèrdues de 1p, 8p23-pter, 9p21-pter, 11q21-q23 i 13q, que són les mateixes que s'observen de forma recurrent en els MCL convencionals. Aquestes troballes recolzen la idea que pertanyen a la mateixa entitat biològica compartint patrons d'evolució similars.

L'anàlisi combinat de CGH i microarrays realitzat a partir de DNA i RNA obtingut del mateix teixit, ens ha permès estudiar la relació entre les alteracions genòmiques i

l'expressió de gens localitzats en regions alterades específiques d'aquests MCL, per tal d'identificar gens diana desregulats, com ja s'havia realitzat en un estudi previ del nostre grup també en col·laboració amb el LLMPP en DLBCL.(Bea et al., 2005) Les set regions escollides per a realitzar aquest estudi han estat 1p21-p31, 3q25-qter, 8p21-pter, 9p21-pter, 9q21-q32, 11q21-q23, i 13q32-q33 entre les que es troben algunes regions relacionades amb la proliferació o amb la supervivència dels pacients. En concordança amb el nostre estudi previ en DLBCL, entre un 27% i un 62% dels gens localitzats en aquestes regions cromosòmiques mostraven significativament canvis de l'expressió en els casos que presentaven alteració de la regió. Aquest fenomen pel qual no tots els gens d'una regió alterada varien la seva expressió davant d'una alteració, està en concordança amb altres treballs que s'han realitzat en tumors sòlids. Una possible explicació seria el fet que només una petita part dels gens que formen el genoma són expressats a la cèl·lula normal de la qual deriva la cèl·lula tumoral.(Hyman et al., 2002;Pollack et al., 2002) També és possible que altres alteracions genètiques o una desregulació de gens reguladors clau pugui estar influenciant els nivells d'expressió d'alguns dels gens localitzats en aquestes regions de forma independent a les alteracions genètiques.

Hem vist que alguns dels gens desregulats es troben involucrats en la proliferació cel·lular, com per exemple *YEATS2*, *PICK3*, *ACTL6* (3q27), *RFC4* (3q28) i *CENTB2* (3q29), reparació del dany al DNA i manteniment de l'estabilitat cromosòmica, com per exemple *FANCC* i *XPA* (9q22), *RAD23* (9q32), *ESCO2* (8p21), *ATM* (11q23), *ERCC5* i *LIG4* (13q33), o homeostasi cel·lular i apoptosi, com *BIRC2* (11q22), *SIAH2* (3q25), *CASP1* i *CASP4* (11q21), *CLU* i *TNFRSF10D* (8p21) i *PAK2* (3q29).

Tal i com ja s'ha comentat, les alteracions de 3q25-qter són una característica comú no només en MCL sinó també en el subgrup de ABC-DLBCL.(Bea et al., 2005) Tot i així, el conjunt de gens desregulats degut al guany o amplificació d'aquesta regió cromosòmica, és relativament diferent en els dos tipus de limfoma. Hem pogut avaluar 30 gens en comú de la plataforma *Lymphochip* i els resultats indiquen que el guany d'aquesta regió implica una sobre-expressió de 45% i 36% dels gens en totes dues entitats, respectivament. És interessant el fet que malgrat les diferències existeixin set gens que es troben sobre-expressats en totes dues entitats (*SIAH2*, *PDCD10*, *RFC4*, *OPA1*, *PPP1R2*, *PAK2* i *KIAA0226*) mentre que la sobre-expressió d'un grup de vuit gens (*GPR160*, *PIK3CA*, *SIAT1*, *LPP*, *CCDC50*, *CENTB2*, *ACK1*, i *TFRC*) i un altre 2

gens (*GMPS* i *BDH*) estigués restringida específicament a MCL i ABC-DLBCL, respectivament.

També l'anàlisi per microarrays d'aquests casos ha identificat recentment que la proliferació juga un paper molt important com indicador pronòstic integrant diferents fenòmens oncogènics que es donen en la progressió dels MCLs. (Rosenwald et al., 2003b) També s'ha observat que la quantificació d'aquesta proliferació, mitjançant els nivells d'expressió de 20 gens implicats en proliferació, estratifica els pacients en funció de la seva supervivència, estant els casos poc proliferatius associats a bon pronòstic i els casos altament proliferatius associats a un curs clínic més agressiu. Per altra banda ja s'ha vist en estudis previs que els guanys de 3q, les pèrdues de 8p, 9p, 9q, 13q i 17p estan associats una evolució clínica més ràpida, (Bea et al., 1999; Kohlhammer et al., 2004; Rubio-Moscardo et al., 2005) tot i que la relació d'aquestes alteracions amb la proliferació no està clara. En el nostre estudi, hem observat que els guanys de 3q27-qter, les pèrdues de 8p21-pter, 9p21-pter, i 9q21-q32 estan associades a un pitjor pronòstic, sent els guanys de 3q27-qter i 9q21-q32 alteracions associades a pitjor pronòstic independentment de la proliferació. L'observació de que les pèrdues de 9p21-pter no estiguin associades a pronòstic independentment de la proliferació, té sentit donada l'estreta associació de les pèrdues de *P16^{INK4a}* amb elevats nivells de proliferació de les cèl·lules tumorals. A més, també hem pogut observar que les alteracions de 3q27-qter i 9q21-q32 sembla que tinguin una influència en l'evolució de diferents subtipus de tumors. Per una banda, hem observat que les alteracions de 3q presenten impacte en aquells casos en els que els nivells de proliferació són baixos mentre que les alteracions de 9q semblen afectar a aquell grup de MCL que presenta nivells alts de proliferació.

En conclusió, en aquest estudi en una sèrie llarga de MCL estudiats per CGH hem vist que existeixen alteracions genètiques que presenten un impacte en la supervivència del pacient de forma independent de l'activitat proliferativa del tumor, de manera que un model predictiu que combinés la quantificació de la proliferació i el perfil genètic podria millorar l'estimació del pronòstic del pacient. És per això que s'ha sol·licitant un patent de la combinació de les dades del *Lymphochip* i la CGH inscrita el 25 de juliol del 2006 amb el nombre 11/493.387 (Estats Units) i el títol, *Methods for identifying, diagnosing, and predicting, survival of lymphomas*.

Un cop estudiades les alteracions secundàries de MCL en aquesta sèrie llarga de MCL, en el tercer estudi d'aquesta tesi va hem analitzat una altra característica molt específica dels MCL, la leucemització. Per tal de dur a terme aquest treball, hem estudiat les característiques a nivell morfològic, immunofenotípic i el perfil genètic de 48 pacients de MCL en funció de la presència o absència d'afectació de la malaltia en sang perifèrica.

L'afectació de sang perifèrica i moll d'os, és una característica ben definida en MCL, malgrat això, la seva incidència no ha estat del tot ben analitzada, és per això que presenta uns valors variables que van d'un 13% a un 77% dels pacients en funció de la sèrie analitzada. Molts d'aquests estudis però tenen certes mancances en el criteri morfològic i immunofenotípic.(Argatoff et al., 1997;Duggan et al., 1990) En el nostre estudi, hem observat mitjançant FC que l'afectació leucèmica és present en gairebé tots els pacients (92%), incloent pacients que a nivell morfològic no presentaven evidència de leucèmia. Les diferències entre el nostre estudi i un estudi anterior, en el qual el percentatge de casos amb leucemització només era del 26% poden ser degudes al baix percentatge de leucemització observat en moll d'os en aquest treball anterior (27%) donat que la seva presència estan estretament relacionades.(Gu et al., 2004)

A més de la translocació t(11;14)(q13;q32), s'han descrit moltes alteracions genètiques secundàries associades a MCL. En un estudi recent, s'ha proposat que les pèrdues de 8p es donen de forma més freqüent en casos amb afectació leucèmica (79% vs. 11%).(Martinez-Climent et al., 2001) A més, s'ha observat en una sèrie petita, que la pèrdua de 8p és l'alteració addicional més freqüent a banda de la t(11;14).(Vizcarra et al., 2001) Cal dir però, que aquests casos presentaven limfocitosi sense afectació ganglionar al diagnòstic, malgrat el MCL és una malaltia fonamentalment ganglionar, per tant podria ser que no fossin MCL leucemitzats, sinó altres entitats amb la t(11;14). En l'estudi per CGH del nostre treball hem vist que les alteracions observades quadren amb estudis anteriors de CGH i que en contrast amb les troballes anteriors, les variants leucèmiques no presenten una freqüència tant elevada de pèrdues de 8p com l'observada en els altres treballs (només 4 pacients amb presentació a nivell morfològic i un pacient amb només expressió detectable per FC). Aquest fet posaria en dubte l'afirmació de que les pèrdues de 8p són un marcador de leucemització com s'havia dit anteriorment. Aquestes discrepàncies poden ser degudes als diferents criteris utilitzats a l'hora de seleccionar els casos, o bé per les diferents definicions d'afectació leucèmica. En el nostre estudi, el diagnòstic s'ha basat en l'evidència morfològica i molecular de MCL. a

diferència d'altres estudis en els quals s'han seleccionat els casos únicament en funció de la presència de t(11;14)(q13;q32), independentment del diagnòstic de MCL..

Per altra banda, no vam observar diferències a nivell d'alteracions genètiques entre els casos amb i sense afectació leucèmica a nivell morfològic, fet relativament lògic donat que la majoria de pacients presentaven afectació detectada per FC. Tot i així es va observar que els casos que presentaven nivells de limfòcits $\geq 5 \times 10^9/L$ presentaven més freqüentment guanys de 3q i pèrdues de 10p, sent l'alteració de 3q, una de les alteracions més freqüents descrites en aquesta malaltia, i pitjor pronòstic.

L'impacte pronòstic de l'expressió leucèmica en MCL és controvertit.(Argatoff et al., 1997;Bosch et al., 1998;Wong et al., 1999) Alguns estudis han mostrat que la presència de limfocitosi al diagnòstic està associada amb un pitjor pronòstic,(Duggan et al., 1990;Samaha et al., 1998) concretament quan el recompte de limfòcits és major de $10 \times 10^9/L$.(Schlette et al., 2001;Pittaluga et al., 1996) Mentre que altres estudis no han trobat diferències a nivell de supervivència entre pacients amb i sense afectació leucèmica. (Cohen et al., 1998;Matutes et al., 2004)

En el nostre estudi, la mitjana de supervivència de la sèrie global és d'uns 30 mesos i no s'observen diferències entre els pacients amb i sense evidència de leucemització a nivell morfològic. Els nivells de cèl·lules tumorals circulants detectades per FC o a nivell morfològic poden ser un indicador de la malaltia, més que no pas un indicador pronòstic.

Després de l'estudi previ en línies cel·lulars de MCL mitjançant la combinació de M-FISH i CGH en el qual vam caracteritzar cariotípicament aquestes línies cel·lulars i vam estudiar els seus patrons d'inestabilitat, vam pensar que seria bo reproduir l'estudi en tumors primaris donat que en segon treball d'aquesta tesi havíem caracteritzat mitjançant CGH una sèrie gran de MCL però no disposàvem informació a nivell de punts de trencament o dels reordenaments presents en aquesta malaltia. Com ja hem comentat, el M-FISH és una tècnica que facilita el cariotipat dels genomes tumorals i permet la identificació de reordenaments complexos, translocacions críptiques i cromosomes marcadors no detectats per citogenètica convencional i proporcionen una quantificació més precisa de la inestabilitat intermetafàsica. En aquest anàlisi hem inclòs 25 mostres de MCL i cinc línies cel·lulars no prèviament estudiades. (HBL-2, MAVER-1, MINO, UPN-1 i Z-138). Com es ben sabut el material necessari per a

L'anàlisi per M-FISH són cèl·lules en divisió. Davant la manca de material fresc, vam utilitzar material criopreservat de 16 de les 25 mostres estudiades.

L'anàlisi ens ha mostrat que el 83% dels casos presenten cariotips alterats amb un elevat nombre d'alteracions estructurals, preferentment alteracions dels cromosomes 8, 10 i 1, i de 11 i 14 degut a la translocació t(11;14), i d'alteracions numèriques. Com era d'esperar pels nostres resultats anteriors, les línies cel·lulars mostren cariotips més complexos que els tumors primaris, amb alteracions estructurals en les que els cromosomes 9, 1 i 8 eren els més reordenats. Cal esmentar que no hem trobat translocacions recurrents, malgrat hem identificat algunes alteracions cromosòmiques que presenten punts de trencament recurrents implicats en els reordenaments. És interessant el fet que del conjunt de línies cel·lulars i tumors primaris, els cromosomes més alterats siguin 1 i 8 concretament les regions 1p22 i 8p11 (trobat en 4 casos i 2 línies cel·lulars cadascun). Hem vist que les alteracions que impliquen 1p22 preferentment estan associades a una pèrdua de material fet esperat donat que les alteracions de 1p21-p31 són de les més freqüents en MCL.(Bentz et al., 2000;Allen et al., 2002;Schraders et al., 2005;Tagawa et al., 2005) En contrast les alteracions a 8p22 estan implicades de forma preferent en reordenaments complexos, que a més en dos casos inclouen la t(11;14). Pel que sabem aquest és el primer estudi que s'ha realitzat en una sèrie llarga de MCL utilitzat M-FISH o SKY. Si comparem amb altres estudis realitzats en altres neoplàsies de cèl·lula B, la nostra sèrie presenta el nivell més elevat d'alteracions.(Lestou et al., 2003;Karpova et al., 2006;Baro et al., 2007;Nanjangud et al., 2007)en acord amb els resultats observats mitjançant altres tècniques. (Salaverria et al., 2006)

Per altra banda, malgrat no hem observat alteracions recurrents a banda de la t(11;14), hem identificat punts de trencament recurrents alguns dels quals 1p32, 3q25, 4q11, 8p11, 8q11, 10p14, 11q23, i 15q22 no s'havien descrit mai com a punts associats a alteració estructural. Aquesta informació és novedosa, donat que malgrat s'han descrit molts punts de trencament però aquests no sempre estan associats a alteracions estructurals, sinó que poden estar associades a amplificacions. En el primer estudi presentat en aquesta tesi, hem calculat la inestabilitat cromosòmica de 5 línies cel·lulars basant-nos en la variabilitat del nombre modal i la variabilitat en bases a les alteracions estructurals no-clonals. En aquest últim treball hem reproduït aquest estudi en la sèrie de tumors primaris i en les cinc línies addicionals i hem observat que els nivells d'inestabilitat són similars en la majoria dels tumors i en les línies cel·lulars, amb

l'excepció de JVM-2 que no presenta variabilitat de nombre modal ni variabilitat basada en alteracions estructurals no-clonals, de forma similar a un grup de quatre casos de MCL molt estables.

També hem descobert que la línia cel·lular MINO presenta cromosomes de Y malgrat suposadament estava derivada d'un pacient de MCL de sexe femení.(Lai et al., 2002) L'explicació d'aquest fenomen pot ser la deleció del gen *Sex-determining region Y (SRY)* que codifica pel factor determinant de testicles (TDF), que s'encarrega d'iniciar la determinació sexual en homes.

Per altra banda, ha estat descrit que els casos els casos MCL típics amb inactivació d'*ATM* presenten més nombres d'alteracions.(Camacho et al., 2002) En l'estudi actual amb casos totalment independents de MCL, el nombre d'alteracions (tant numèriques com estructurals) és més alt en els casos amb deleció d'*ATM* malgrat no presenta significació estadística. L'estudi actual és limitat donat que no hem estudiat les mutacions d'*ATM*, malgrat tot sembla que es manifesta l'associació entre la inactivació d'*ATM* i els cariotips complexos.

Estudis recents han identificats translocacions $t(11;14)(q13;q32)$ críptiques en MCL utilitzant la combinació de CC i FISH en 18 casos (Gazzo et al., 2005) i la combinació de FISH i M-FISH en casos puntuals (Wong, 1999;Gruszka-Westwood et al., 2002;Maravelaki et al., 2004;Gazzo et al., 2006) En la nostra sèrie hem identificat un grup de cinc tumors primaris i quatre línies cel·lulars que presenten translocacions $t(11;14)$ complexes. La utilització del M-FISH a permès identificar la translocació complexa $t(11;14)$ en el cas M9 mentre que en el cas M6 i en les línies cel·lulars UPN-1 i MINO, la translocació $t(11;14)$ críptica només s'ha pogut detectar mitjançant la combinació de M-FISH i FISH. També és interessant el fet que dos casos i una línia cel·lular presentessin la $t(11;14)$ reordenada amb el cromosoma 8, fet que ja s'havia descrit anteriorment en un cas per Gazzo et al.(Gazzo et al., 2005) Cada cop existeixen més evidències que demostren que els reordenaments entre cromosomes no són a l'atzar. En els nuclis interfàsics de cèl·lules de mamífers i pollastre, els cromosomes no es posicionen a l'atzar en el nucli si no que ho fan en funció de la seva densitat o la seva mida. S'ha suggerit per tant que la proximitat física afavoreix els intercanvis de material entre cromosomes pròxims (Sachs et al., 1997) En aquest sentit, s'ha observat que els cromosomes 11 i 8 es troben propers, no només en les rosetes mitòtiques sinó també en el nucli interfàsic.(Nagele et al., 1999)

La formulació d'aquestes translocacions complexes segueix diferents regles estàndards,(ISCN 1995, 1995) malgrat tot nosaltres pensem que la nomenclatura actual no pot descriure del tot aquestes alteracions específiques de MCL, de manera que es remarqui que l'alteració t(11;14) és un fenomen inicial i que aquestes alteracions complexes són fenòmens secundaris en el desenvolupament dels tumors. És per això que suggerim una nomenclatura específica per aquestes translocacions complexes com ja s'ha desenvolupat per a altres alteracions com és el cas del isocromosoma Philadelphia (ISCN 2005, 2005)

En aquest estudi també suggerim que l'expressió del transcrit de *CCND1* sense la regió 3'UTR, pot ser causada pel truncament del gen de la *CCND1* generat per una translocació a 3', a més de la translocació a 5' típica t(11;14)(q13;q32), com a mínim en una línia cel·lular i un tumor primari. D'aquesta manera suggerim que a més de la t(11;14), altres fenòmens al locus *CCND1* poden ser la causa d'alteracions de l'estructura del RNA de *CCND1* en MCL, de la mateixa manera que s'ha demostrat per les mutacions.(Wiestner et al., 2007)

També està demostrat que els cariotips complexos estan associats a un curs clínic més agressiu en MCL.(Bea et al., 1999) En aquesta sèrie malgrat el nombre de casos és limitat, hem trobat correlació entre l'elevat nombre d'alteracions numèriques i no-clonals i pitjor pronòstic. A més les pèrdues de 8p i 9p detectades per M-FISH i/o CGH estan també associades a un pitjor pronòstic malgrat la mida reduïda de la sèrie; aquestes regions ja han prèviament descrites com associades a pitjor pronòstic independentment de les sèries de MCL.(Bea et al., 1999;Allen et al., 2002;Kohlhammer et al., 2004;Rubio-Moscardo et al., 2005)

En aquesta tesi hem posat de manifest, que les alteracions genètiques i moleculars que es donen en MCL, ja siguin guanys, pèrdues, amplificacions o translocacions, poden integrar-se juntament amb els canvis en l'expressió i en l'evolució clínica del pacient per tal de crear un model patogenètic que pugui proporcionar la base per a una avaluació més precisa del tumor i una millora del tractament que se li doni al pacient.

CONCLUSIONS

- 1. Les línies cel·lulars de MCL presenten cariotips complexos amb un elevat nombre d'alteracions numèriques i estructurals, presentant major inestabilitat que els tumors primaris, però certa semblança entre elles (excepte JVM-2).**
- 2. Els guanys de 3q27-qter i les pèrdues de 9q21-q32 en MCL estan associats a una pitjor supervivència del pacient de forma independent de l'activitat proliferativa del tumor.**
- 3. L'impacte de les alteracions de 3q27-qter afecta a la supervivència dels pacients amb baixa proliferació mentre que les pèrdues de 9q21-q32 semblen afectar al pronòstic en pacients amb un elevat índex proliferatiu.**
- 4. Un percentatge elevat dels gens localitzats en regions alterades en MCL varia la seva expressió en funció de l'alteració, molts d'ells implicats en la proliferació cel·lular, la reparació del dany al DNA i manteniment de l'estabilitat cromosòmica, l'homeostasi cel·lular o bé l'apoptosi.**
- 5. L'expressió leucèmica és un fenomen molt comú en MCL, fins i tot en pacients amb un comptatge de limfòcits normal.**
- 6. Els casos amb un recompte de limfòcits $\geq 5 \times 10^9/L$ estan associats a guanys de 3q i pèrdues de 10p i a una pitjor supervivència dels pacients.**

- 7. La combinació de M-FISH, FISH, CGH i CGH array ofereix una aproximació més específica per tal de determinar l'elevat grau de translocacions complexes en MCL, delimitant regions freqüents de guany i pèrdua, i punts de trencament recurrents.**

- 8. Els MCLs estudiats per una combinació de diferents tècniques citogeneticomoleculares, no presenten translocacions recurrents a banda de la translocació t(11;14)(q13;q32), malgrat tot presenten translocacions críptiques que impliquen els loci *IGH* i *CCND1* i punts de trencament recurrent.**

- 9. Els MCL i les línies cel·lulars de MCL presenten de forma freqüent reordenaments que impliquen els cromosomes 1 i 8. Les alteracions que impliquen 1p22 preferentment estan associades a una pèrdua de material mentre que les alteracions a 8p22 estan implicades de forma preferent en reordenaments complexos, alguns dels quals inclouen la t(11;14).**

ANNEXES

Annex 1. Haematologica. 2008 Jan;93(1):132-6.**Gene expression profile and genomic changes in disease progression of early-stage chronic lymphocytic leukemia**

Verònica Fernandez V, Pedro Jares , **Itziar Salaverria**, Eva Giné, Silvia Beà , Marta Aymerich, Dolors Colomer, Neus Villamor, Francesc Bosch, Emili Montserrat, Elias Campo.

The biological mechanisms involved in the clinical progression from early stages of patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) are not well known. We investigated sequential samples from 16 CLL untreated patients obtained at diagnosis in early stage and after progression before treatment. One patient had a p16^{INK4a} homozygous deletion at diagnosis and progression, and three patients acquired a p53 mutation, gains of 5q21-q23 and 11pter-p14, and a gain of chromosome 12, respectively, during the progression of the disease. Gene expression profile analysis showed a significant modulation of 58 genes with a particular downregulation of genes that are inhibitors of cell adhesion and motility.

Annex 2. J Clin Oncol. 2004 Sep 1;22:3498-506**Clinicopathologic significance and prognostic value of chromosomal imbalances in diffuse large B-cell lymphomas.**

Sílvia Beà, Lluís Colomo, Armando López-Guillermo, **Itziar Salaverria**, Xavier Puig, Magda Pinyol, Susana Rives, Emili Montserrat, Elias Campo

Purpose: To determine the clinicopathologic significance and prognostic value of chromosomal imbalances in diffuse large B-cell lymphomas (DLBCL).

Patients and methods: We have examined 64 tumors at diagnosis using comparative genomic hybridization and real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR), single-stranded conformational polymorphism, and DNA sequencing for the analysis of several potential target genes.

Results: The most recurrent alterations were gains of 18q (20%), Xq (15%), 2p, 7q, and 12p (14%), and losses of 6q and 17p (14%). Frequent high-level DNA amplifications were detected at 2p13-p16 and 18q21 loci. Real-time quantitative PCR detected REL and BCL11A gene amplifications in the nine patients with gains at 2p13-p16 and only in one additional patient with normal chromosome 2. Similarly, the BCL-2 gene was amplified in the 12 tumors with gains of 18q21 but in none of 39 patients with normal 18q profile. p53 gene inactivation was detected in nine of 58 (16%) tumors and was commonly associated with 17p losses. Tumors with 18q gains were significantly associated with a high number of chromosomal imbalances, primary nodal presentation, high serum lactate dehydrogenase levels, high International Prognostic Index, shorter cause-specific survival, and a high risk of relapse. Losses of 17p and p53 gene alterations were associated with an absence of complete response achievement.

Conclusion: These results suggest that DLBCLs have a characteristic pattern of genomic alterations; 18q gains or amplifications and 17p losses are associated with particular clinicopathological features and aggressive clinical behavior. Additional studies are needed to confirm these observations in larger series of patients.

Annex 3. Blood. 2005 Nov 1;106:3183-90**Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene-expression-based survival prediction.**

Silvia Bea, Andreas Zettl, George Wright, **Itziar Salaverria**, Philipp Jehn, Victor Moreno, Christof Burek, German Ott, Xavier Puig, Liming Yang, Armando Lopez-Guillermo, Wing C Chan, Timothy C Greiner, Dennis D Weisenburger, James O Armitage, Randy D Gascoyne, Joseph M Connors, Thomas M Grogan, Rita Braziel, Richard I Fisher, Erlend B Smeland, Stein Kvaloy, Harald Holte, Jan Delabie, Richard Simon, John Powell, Wyndham H Wilson, Elaine S Jaffe, Emili Montserrat, Hans-Konrad Muller-Hermelink, Louis M Staudt, Elias Campo, Andreas Rosenwald

Gene-expression profiling has identified 3 major subgroups of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): germinal center B-cell-like (GCB), activated B-cell-like (ABC), and primary mediastinal DLBCL (PMBCL). Using comparative genomic hybridization (CGH), we investigated the genetic alterations of 224 cases of untreated DLBCL (87 GCB-DLBCL, 77 ABC-DLBCL, 19 PMBCL, and 41 unclassified DLBCL) previously characterized by gene-expression profiling. The DLBCL subgroups differed significantly in the frequency of particular chromosomal aberrations. ABC-DLBCL had frequent trisomy 3, gains of 3q and 18q21-q22, and losses of 6q21-q22, whereas GCB-DLBCL had frequent gains of 12q12, and PMBCL had gains of 9p21-pter and 2p14-p16. Parallel analysis of CGH alterations, locus-specific gene-expression profiles, and global gene-expression signatures revealed that DNA amplifications and gains had a substantial impact on the expression of genes in the involved chromosomal regions, and some genes were overexpressed in a DLBCL subgroup-specific fashion. Unexpectedly, specific chromosomal alterations were associated with significant changes in gene-expression signatures that reflect various aspects of lymphoma cell biology as well as the host response to the lymphoma. In addition, gains involving the chromosomal region 3p11-p12 provided prognostic information that was statistically independent of the previously defined gene-expression-based survival model, thereby improving its predictive power.

Annex 4. Blood. 2006 Feb 1;107(3):1101-7**Loss of major histocompatibility class II expression in non-immune privileged site diffuse large B cell lymphoma is highly coordinated and not due to chromosomal deletions.**

Lisa M Rimsza, Robin A Roberts, Elias Campo, Thomas M Grogan, Silvia Bea, **Itziar Salaverria**, Andreas Zettl, Andreas Rosenwald, German Ott, Konrad Muller-Hermelink, Jan Delabie, Richard I Fisher, Joseph M Unger, Michael Leblanc, Louis M Staudt, Elaine S Jaffe, Randy D Gascoyne, Wing C Chan, Dennis D Weinsenberger, Timothy C Greiner, Rita M Braziel, Thomas P Miller

Decreased Major Histocompatibility Class II (MHCII) expression is associated with poor survival in diffuse large B cell lymphoma (DLBCL). Immune-privileged site DLBCL (IP-DLBCL) patients reportedly have frequent large deletions at the MHCII locus while the mechanism of decreased expression in non-IP DLBCL is unknown. Gene expression profiling data was used for correlation analyses between expression levels of MHCII genes with each other and their transcriptional regulator, CIITA. Comparative genomic hybridization (CGH) assessed chromosomal alterations at MHCII related loci. Finally, a map was created of expression of genes that are telomeric, within, or centromeric to the MHCII locus. Correlation coefficients among MHCII genes ranged from 0.73 to 0.92, while those between adjacent and intervening genes were lower (-0.12 to 0.49). Correlations between MHCII and CIITA expression were higher (0.53 to 0.60) than between CIITA and neighboring genes (-0.05 to 0.22). In 23 MHCII (-) cases, CGH detected 2 losses and 2 gains at MHCII loci. Expression of genes telomeric, within, and centromeric to MHCII loci were near normal in most MHCII(-) cases. Large deletions of the MHCII locus are uncommon in non-IP DLBCL, implicating altered transcription as the operative mechanism for decreased expression.

Annex 5. Haematologica. 2004 Nov ;89:1322-31**Frequent polymorphic changes but not mutations of TRAIL receptors DR4 and DR5 in mantle cell lymphoma and other B-cell lymphoid neoplasms.**

Verònica Fernández, Pedro Jares, Sílvia Beà, **Itziar Salaverria**, Elisabet Guino, Sílvia de Sanjosé, Dolors Colomer, German Ott, Emili Montserrat, Elias Campo

Background and objectives: Tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptors DR4 and DR5 have been mapped to chromosome 8p21-22, a region frequently deleted in different lymphoid neoplasms.

Design and methods: To investigate the potential alterations of these genes in lymphoid neoplasms, we examined the presence of gene mutations in exons 3, 4, and 9 in 69 cases with mantle cell lymphoma (MCL), 16 with chronic lymphocytic leukemia (CLL), 12 with follicular lymphomas (FL) and 17 with large B-cell-lymphomas (DLBCL), as well as in 4 lymphoid cell lines carrying the t(11;14) translocation, and 91 healthy blood donors.

Results: Three CLL and three MCL cases had 8p deletions. Two nucleotide changes in or near the intron 3 splice consensus sequence and a silent change were found. These rare changes were also present in the germ-line of the patients. The DR4 death domain A1322G polymorphism was significantly more frequent in MCL [odds ratio (OR) = 5.9; 95% confidence interval (CI), 1.92-18.1] and CLL (OR = 4.5; CI, 1.18-17) patients than in a sex and age-adjusted healthy population. In contrast, the DR4 exon 4 C626G polymorphism was associated with a significant overall decreased risk for MCL (OR = 0.3; CI, 0.12-0.8). No mutations or cancer-associated polymorphic changes were found in DR5 domains.

Interpretation and conclusions: These findings indicate that mutations of DR4 and DR5 are uncommon in lymphoid neoplasms but DR4 polymorphic alleles may contribute to the pathogenesis of these malignancies.

Annex 6. Haematologica. 2006 Jan ;91:11-6**Mantle cell lymphoma: from pathology and molecular pathogenesis to new therapeutic perspectives.**

Itziar Salaverria, Patricia Perez-Galan, Dolors Colomer, Elias Campo

Mantle cell lymphoma (MCL) is a well defined lymphoid neoplasm genetically characterized by the t(11;14)(q13;q32) translocation leading to a constitutive overexpression of Cyclin D1. This lymphoma is composed of a monomorphic proliferation of small to medium size lymphoid cells with irregular nuclei of mature B-cell phenotype commonly coexpressing CD5. The correlation between these specific pathological characteristics and the genetic and molecular alterations have been crucial in defining this lymphoma and recognizing its broad morphological and clinical manifestations that in turn have lead to a better understanding of the molecular mechanisms underlying the development and progression of the disease. The clinical behavior is very aggressive and few patients may be considered cured or reach long survival with current therapeutic protocols. The better knowledge of this disease, the development of new preclinical models, and the emergency of a new generation of drugs are facilitating the design of new therapeutic strategies that may overcome the resistance of this aggressive lymphoma to conventional treatments and may improve the life expectancy of the patients.

Annex 7. Leukemia (enviat)**Chromosomal alterations detected by comparative genomic hybridization (CGH)
in subgroups of gene expression-defined Burkitt lymphoma**

Itziar Salaverria, Andreas Zettl, Silvia Beà, Elena M. Hartmann, Sandeep Dave, George Wright, Evert-Jan G. Boerma, Philip M. Kluin, German Ott, Wing.C. Chan, Dennis D. Weisenburger, Armando Lopez-Guillermo, Randy.D. Gascoyne, Jan Delabie, Lisa Rimsza, Rita. M. Braziel, Ellen S. Jaffe, Louis M. Staudt, Hans K. Müller-Hermelink, Elias Campo, Andreas Rosenwald.

Burkitt lymphoma (BL) is an aggressive B-cell lymphoma characterized by typical morphological, immunophenotypic and molecular features. Gene expression profiling studies provided a molecular signature of BL, but also demonstrated that a subset of aggressive B-cell lymphomas not fulfilling the current WHO criteria for the diagnosis of BL nonetheless show a molecular signature of BL ('discrepant' BL). Given the different treatment approaches between BL and diffuse large B-cell lymphomas (DLBCL) we investigated molecular differences within gene expression-defined BL. We studied tumors from 51 BL patients including 26 classic BL, 17 atypical and 8 'discrepant' BL by comparative genomic hybridization (CGH) and gene expression profiling. Our results show that classic and atypical BL (excluding 'discrepant' BL), in adult as well as pediatric cases do not differ in underlying genomic imbalances or overall gene expression suggesting that these subgroups are molecularly homogeneous. 'Discrepant BL', however, differ dramatically in the absolute number and localizations of genomic imbalances from classic/atypical BL as well as from DLBCL. Moreover, this category includes lymphomas that carry both the t(14;18) and t(8;14) translocations and are clinically characterized by presentation in adult patients and an aggressive course. 'Discrepant' BL may therefore form a distinct genetic subgroup of aggressive B-cell lymphomas.

Annex 8. Br J Haematol. 2008**Genomic profiling reveals different genetic aberrations in systemic ALK-positive and ALK-negative Anaplastic Large Cell Lymphomas**

Itziar Salaverria, Silvia Beà, Armando Lopez-Guillermo, Virginia Lespinet, Magda Pinyol, Birgit Burkhardt, Laurence Lamant, Andreas Zettl, Doug Horsman, Randy Gascoyne, German Ott, Reiner Siebert, Georges Delsol, Elias Campo

Anaplastic large cell lymphoma (ALCL) is a T/null-cell neoplasm characterized by chromosomal translocations involving the anaplastic lymphoma kinase (*ALK*) gene. Tumors with similar morphology and phenotype but negative for ALK have been also recognized. The secondary chromosomal imbalances of these lymphomas are not well known. We have examined 74 ALCL, 43 ALK-positive and 31 ALK-negative, by comparative genomic hybridization (CGH), and locus specific alterations for *TP53* and *ATM* genes were examined by FISH and real-time quantitative PCR. Chromosomal imbalances were detected in twenty-five (58%) ALK-positive and in 20 (65%) ALK-negative ALCL. ALK-positive ALCL with *NPM-ALK* or other *ALK* variant translocations showed a similar profile of secondary genetic alterations. Gains of 17p and 17q24-qter and losses of 4q13-q21, and 11q14 were associated with ALK-positive cases ($P=0.05$) whereas gains of 1q and 6p21 were more frequent in ALK-negative tumors ($P=0.03$). Gains of chromosome 7 and 6q and 13q losses were seen in both types of tumors. ALCL-negative tumors had a significant worse prognosis than ALK-positive. However no specific chromosomal alterations were associated with survival. In conclusion, ALK-positive and negative ALCL have different secondary genomic aberrations suggesting that they correspond to different genetic entities.

Annex 9. Int J Cancer. 2006 Dec 15;119(12):2768-74**Unbalanced expression of licensing DNA replication factors occurs in a subset of mantle cell lymphomas with genomic instability.**

Magda Pinyol, **Itziar Salaverria**, Silvia Bea, Verónica Fernández, Lluís Colomo, Elías Campo, Pedro Jares

DNA licensing is a crucial process for chromosome replication control. Deregulation of the licensing factors Cdt1, Cdc6 and the licensing inhibitor geminin has been associated with DNA replication defects and chromosomal instability. We examined the expression of these factors, in mantle cell lymphoma (MCL) and non-neoplastic lymphoid samples, and analysed the potential role of their deregulation in genomic instability. Geminin, Cdt1 and Cdc6 were coordinately expressed in non-neoplastic tissues and most MCL in relationship to the proliferative activity of the cells. However, 6 (18%) tumours showed an unbalanced "licensing signature" characterized by a higher expression of Cdt1 and Cdc6 than the negative regulator geminin. Tumours with this unbalanced signature and p53/p14(ARF) alterations had significantly higher number of chromosome abnormalities than lymphomas with p53/p14(ARF) alterations but with a normal licensing signature. No aberrations of Cdt1, Cdc6, and geminin genes were detected in cases with unbalanced licensing. However, tumours with p53/ARF inactivation and unbalanced licensing signature had significantly higher cyclin D1 levels than tumours with normal licensing signature. These results suggest that an unbalanced mRNA expression of licensing regulatory genes may play a role in the pathogenesis of the chromosomal instability of a subset of MCL with inactivation of the p53/p14(ARF) pathway.

Annex 10. Int J Cancer. 2006 Jan 15;118(2):357-63.**Analysis of Aurora-A and hMPS1 mitotic kinases in mantle cell lymphoma**

Camacho E, Beà S, **Salaverria I**, López-Guillermo A, Puig X, Benavente Y, de Sanjosé S, Campo E, Hernández L.

Aurora-A and hMPS1 are kinases involved in spindle checkpoint and centrosome duplication regulation and whose alterations have been associated with cell transformation and chromosome instability in different tumor models. In this study, we have examined the possible alterations of these genes in 58 mantle cell lymphomas (MCLs) and 4 MCL-related cell lines. Aurora-A was also examined in 46 diffuse large B-cell lymphomas (DLBCLs). Aurora-A and hMPS1 mRNA expression levels were related to tumor proliferative activity. Interestingly, a MCL case with the highest number of chromosomal imbalances also showed an extremely high value of Aurora-A mRNA expression. No Aurora-A gene amplifications were detected in any tumor or cell line, whereas hemizygous hMPS1 gene deletions were observed in 23% of MCLs and 3 of the 4 cell lines. However, no expression alterations or gene mutations were detected in these cases. The Aurora-A proposed cancer susceptibility polymorphic variant (P31I) was observed with a similar frequency in MCL, DLBCL, chronic lymphocytic leukemia and in the 431 healthy controls. However, the 3 MCLs and 4 DLBCLs with the homozygous variant of this polymorphism had particular clinical characteristics with an unusual early-age presentation and second epithelial malignancies in MCL and extranodal origin in DLBCL. These findings indicate that Aurora-A and hMPS1 aberrations are uncommon in aggressive lymphomas but Aurora-A overexpression may contribute to numerical chromosomal alterations in occasional MCL. Although the Aurora-A P31I polymorphic variant is not directly involved in a genetic predisposition to these lymphomas, it may modulate the clinical presentation of these tumors.

BIBLIOGRAFIA

- Albertson DG, Collins C, McCormick F, & Gray JW Chromosome aberrations in solid tumors. *Nat Genet* 34: 369-376.2003.
- Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JI, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson J, Jr., Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Levy R, Wilson W, Grever MR, Byrd JC, Botstein D, Brown PO, & Staudt LM Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403: 503-511.2000.
- Allen JE, Hough RE, Goepel JR, Bottomley S, Wilson GA, Alcock HE, Baird M, Lorigan PC, Vandenberghe EA, Hancock BW, & Hammond DW Identification of novel regions of amplification and deletion within mantle cell lymphoma DNA by comparative genomic hybridization. *Br J Haematol* 116: 291-298.2002.
- Argatoff LH, Connors JM, Klasa RJ, Horsman DE, & Gascoyne RD Mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study of 80 cases. *Blood* 89: 2067-2078.1997.
- Armstrong F, Duplantier MM, Trempat P, Hieblot C, Lamant L, Espinos E, Racaud-Sultan C, Allouche M, Campo E, Delsol G, & Touriol C Differential effects of X-ALK fusion proteins on proliferation, transformation, and invasion properties of NIH3T3 cells. *Oncogene* 23: 6071-6082.2004.
- Avet-Loiseau H, Vigier M, Moreau A, Mellerin MP, Gaillard F, Harousseau JL, Bataille R, & Milpied N Comparative genomic hybridization detects genomic abnormalities in 80% of follicular lymphomas. *Br J Haematol* 97: 119-122.1997.
- Baro C, Salido M, Espinet B, Astier L, Domingo A, Granada I, Milla F, Carrio A, Costa D, Luno E, Hernandez JM, Campo E, Florensa L, Ferrer A, Salar A, Bellosillo B, Besses C, Serrano S, & Sole F New chromosomal alterations in a series of 23 splenic marginal zone lymphoma patients revealed by Spectral Karyotyping (SKY). *Leuk Res.*2007.
- Barth TF, Dohner H, Werner CA, Stilgenbauer S, Schlotter M, Pawlita M, Lichter P, Moller P, & Bentz M Characteristic pattern of chromosomal gains and losses in primary large B-cell lymphomas of the gastrointestinal tract. *Blood* 91: 4321-4330.1998.
- Barth TF, Muller S, Pawlita M, Siebert R, Rother JU, Mechttersheimer G, Kitinya J, Bentz M, & Moller P Homogeneous immunophenotype and paucity of secondary genomic aberrations are distinctive features of endemic but not of sporadic Burkitt's lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma with MYC rearrangement. *J Pathol* 203: 940-945.2004.
- Bea S, Colomo L, Lopez-Guillermo A, Salaverria I, Puig X, Pinyol M, Rives S, Montserrat E, & Campo E Clinicopathologic significance and prognostic value

- of chromosomal imbalances in diffuse large B-cell lymphomas. *J Clin Oncol* 22: 3498-3506.2004.
- Bea S, Lopez-Guillermo A, Ribas M, Puig X, Pinyol M, Carrio A, Zamora L, Soler F, Bosch F, Stilgenbauer S, Colomer D, Miro R, Montserrat E, & Campo E Genetic imbalances in progressed B-cell chronic lymphocytic leukemia and transformed large-cell lymphoma (Richter's syndrome). *Am J Pathol* 161: 957-968.2002.
- Bea S, Ribas M, Hernandez JM, Bosch F, Pinyol M, Hernandez L, Garcia JL, Flores T, Gonzalez M, Lopez-Guillermo A, Piris MA, Cardesa A, Montserrat E, Miro R, & Campo E Increased number of chromosomal imbalances and high-level DNA amplifications in mantle cell lymphoma are associated with blastoid variants. *Blood* 93: 4365-4374.1999.
- Bea S, Tort F, Pinyol M, Puig X, Hernandez L, Hernandez S, Fernandez PL, van Lohuizen M, Colomer D, & Campo E BMI-1 gene amplification and overexpression in hematological malignancies occur mainly in mantle cell lymphomas. *Cancer Res* 61: 2409-2412.2001.
- Bea S, Zettl A, Wright G, Salaverria I, Jehn P, Moreno V, Burek C, Ott G, Puig X, Yang L, Lopez-Guillermo A, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Gascoyne RD, Connors JM, Grogan TM, Braziel R, Fisher RI, Smeland EB, Kvaloy S, Holte H, Delabie J, Simon R, Powell J, Wilson WH, Jaffe ES, Montserrat E, Muller-Hermelink HK, Staudt LM, Campo E, & Rosenwald A Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene-expression-based survival prediction. *Blood* 106: 3183-3190.2005.
- Benharroch D, Meguerian-Bedoyan Z, Lamant L, Amin C, Brugieres L, Terrier-Lacombe MJ, Haralambieva E, Pulford K, Pileri S, Morris SW, Mason DY, & Delsol G ALK-positive lymphoma: a single disease with a broad spectrum of morphology. *Blood* 91: 2076-2084.1998.
- Bentz M, Barth TF, Bruderlein S, Bock D, Schwerer MJ, Baudis M, Joos S, Viardot A, Feller AC, Muller-Hermelink HK, Lichter P, Dohner H, & Moller P Gain of chromosome arm 9p is characteristic of primary mediastinal B-cell lymphoma (MBL): comprehensive molecular cytogenetic analysis and presentation of a novel MBL cell line. *Genes Chromosomes Cancer* 30: 393-401.2001.
- Bentz M, Huck K, du MS, Joos S, Werner CA, Fischer K, Dohner H, & Lichter P Comparative genomic hybridization in chronic B-cell leukemias shows a high incidence of chromosomal gains and losses. *Blood* 85: 3610-3618.1995.
- Bentz M, Plesch A, Bullinger L, Stilgenbauer S, Ott G, Muller-Hermelink HK, Baudis M, Barth TF, Moller P, Lichter P, & Dohner H t(11;14)-positive mantle cell lymphomas exhibit complex karyotypes and share similarities with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 27: 285-294.2000.

- Bentz M, Plesch A, Stilgenbauer S, Dohner H, & Lichter P Minimal sizes of deletions detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 21: 172-175.1998.
- Bentz M, Werner CA, Dohner H, Joos S, Barth TF, Siebert R, Schroder M, Stilgenbauer S, Fischer K, Moller P, & Lichter P High incidence of chromosomal imbalances and gene amplifications in the classical follicular variant of follicle center lymphoma. *Blood* 88: 1437-1444.1996.
- Berglund M, Enblad G, Flordal E, Lui WO, Backlin C, Thunberg U, Sundstrom C, Roos G, Allander SV, Erlanson M, Rosenquist R, Larsson C, & Lagercrantz S Chromosomal imbalances in diffuse large B-cell lymphoma detected by comparative genomic hybridization. *Mod Pathol* 15: 807-816.2002.
- Bhattacharyya NP, Skandalis A, Ganesh A, Groden J, & Meuth M Mutator phenotypes in human colorectal carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 6319-6323.1994.
- Bosch F, Lopez-Guillermo A, Campo E, Ribera JM, Conde E, Piris MA, Vallespi T, Woessner S, & Montserrat E Mantle cell lymphoma: presenting features, response to therapy, and prognostic factors. *Cancer* 82: 567-575.1998.
- Botstein D, White RL, Skolnick M, & Davis RW Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32: 314-331.1980.
- Brececic L, Verdorfer I, Saul W, Trautmann U, & Gebhart E The cytogenetic view of standard comparative genomic hybridization (CGH): deletions of 20q in human leukemia as a measure of the sensitivity of the technique. *Anticancer Res* 21: 89-92.2001.
- Calin GA, Pekarsky Y, & Croce CM The role of microRNA and other non-coding RNA in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 20: 425-437.2007.
- Camacho E, Bea S, Salaverria I, Lopez-Guillermo A, Puig X, Benavente Y, de Sanjose S, Campo E, & Hernandez L Analysis of Aurora-A and hMPS1 mitotic kinases in mantle cell lymphoma. *Int J Cancer* 118: 357-363.2006.
- Camacho E, Hernandez L, Hernandez S, Tort F, Bellosillo B, Bea S, Bosch F, Montserrat E, Cardesa A, Fernandez PL, & Campo E ATM gene inactivation in mantle cell lymphoma mainly occurs by truncating mutations and missense mutations involving the phosphatidylinositol-3 kinase domain and is associated with increasing numbers of chromosomal imbalances. *Blood* 99: 238-244.2002.
- Campo E, Miquel R, Krenacs L, Sorbara L, Raffeld M, & Jaffe ES Primary nodal marginal zone lymphomas of splenic and MALT type. *Am J Surg Pathol* 23: 59-68.1999a.
- Campo E, Raffeld M, & Jaffe ES Mantle-cell lymphoma. *Semin Hematol* 36: 115-127.1999b.

- Camps J, Morales C, Prat E, Ribas M, Capella G, Egozcue J, Peinado MA, & Miro R Genetic evolution in colon cancer KM12 cells and metastatic derivatives. *Int J Cancer* 110: 869-874.2004.
- Chowdary DR, Dermody JJ, Jha KK, & Ozer HL Accumulation of p53 in a mutant cell line defective in the ubiquitin pathway. *Mol Cell Biol* 14: 1997-2003.1994.
- Cigudosa JC, Rao PH, Calasanz MJ, Odero MD, Michaeli J, Jhanwar SC, & Chaganti RS Characterization of nonrandom chromosomal gains and losses in multiple myeloma by comparative genomic hybridization. *Blood* 91: 3007-3010.1998.
- Cohen PL, Kurtin PJ, Donovan KA, & Hanson CA Bone marrow and peripheral blood involvement in mantle cell lymphoma. *Br J Haematol* 101: 302-310.1998.
- Colleoni GW, Bridge JA, Garicochea B, Liu J, Filippa DA, & Ladanyi M ATIC-ALK: A novel variant ALK gene fusion in anaplastic large cell lymphoma resulting from the recurrent cryptic chromosomal inversion, inv(2)(p23q35). *Am J Pathol* 156: 781-789.2000.
- Collins K, Jacks T, & Pavletich NP The cell cycle and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 2776-2778.1997.
- Cools J, Wlodarska I, Somers R, Mentens N, Pedoutour F, Maes B, Wolf-Peeters C, Pauwels P, Hagemeijer A, & Marynen P Identification of novel fusion partners of ALK, the anaplastic lymphoma kinase, in anaplastic large-cell lymphoma and inflammatory myofibroblastic tumor. *Genes Chromosomes Cancer* 34: 354-362.2002.
- Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, Marce S, Lopez-Guillermo A, Campo E, & Montserrat E ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 348: 1764-1775.2003.
- Cuneo A, Bigoni R, Rigolin GM, Roberti MG, Bardi A, Piva N, Milani R, Bullrich F, Veronese ML, Croce C, Birg F, Dohner H, Hagemeijer A, & Castoldi G Cytogenetic profile of lymphoma of follicle mantle lineage: correlation with clinicobiologic features. *Blood* 93: 1372-1380.1999.
- Daigo Y, Chin SF, Gorringer KL, Bobrow LG, Ponder BA, Pharoah PD, & Caldas C Degenerate oligonucleotide primed-polymerase chain reaction-based array comparative genomic hybridization for extensive amplicon profiling of breast cancers : a new approach for the molecular analysis of paraffin-embedded cancer tissue. *Am J Pathol* 158: 1623-1631.2001.
- Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, Buchbinder A, Budman D, Dittmar K, Kolitz J, Lichtman SM, Schulman P, Vinciguerra VP, Rai KR, Ferrarini M, & Chiorazzi N Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94: 1840-1847.1999.
- Dave SS, Fu K, Wright GW, Lam LT, Kluin P, Boerma EJ, Greiner TC, Weisenburger DD, Rosenwald A, Ott G, Muller-Hermelink HK, Gascoyne RD, Delabie J,

- Rimsza LM, Braziel RM, Grogan TM, Campo E, Jaffe ES, Dave BJ, Sanger W, Bast M, Vose JM, Armitage JO, Connors JM, Smeland EB, Kvaloy S, Holte H, Fisher RI, Miller TP, Montserrat E, Wilson WH, Bahl M, Zhao H, Yang L, Powell J, Simon R, Chan WC, & Staudt LM Molecular diagnosis of Burkitt's lymphoma. *N Engl J Med* 354: 2431-2442.2006.
- Dave SS, Wright G, Tan B, Rosenwald A, Gascoyne RD, Chan WC, Fisher RI, Braziel RM, Rimsza LM, Grogan TM, Miller TP, LeBlanc M, Greiner TC, Weisenburger DD, Lynch JC, Vose J, Armitage JO, Smeland EB, Kvaloy S, Holte H, Delabie J, Connors JM, Lansdorp PM, Ouyang Q, Lister TA, Davies AJ, Norton AJ, Muller-Hermelink HK, Ott G, Campo E, Montserrat E, Wilson WH, Jaffe ES, Simon R, Yang L, Powell J, Zhao H, Goldschmidt N, Chiorazzi M, & Staudt LM Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N Engl J Med* 351: 2159-2169.2004.
- de Boer CJ, Vaandrager JW, van Krieken JH, Holmes Z, Kluin PM, & Schuurin E Visualization of mono-allelic chromosomal aberrations 3' and 5' of the cyclin D1 gene in mantle cell lymphoma using DNA fiber fluorescence in situ hybridization. *Oncogene* 15: 1599-1603.1997.
- de Leeuw RJ, Davies JJ, Rosenwald A, Bebb G, Gascoyne RD, Dyer MJ, Staudt LM, Martinez-Climent JA, & Lam WL Comprehensive whole genome array CGH profiling of mantle cell lymphoma model genomes. *Hum Mol Genet* 13: 1827-1837.2004.
- Delsol,G., Ralfkiaer,E., Stein,H., Wright,D., & Jaffe,E. (2001) Mature T-cell and NK-Cell neoplasms, Anaplastic large cell lymphoma. IARC press, Lyon.
- Dierlamm J, Rosenberg C, Stul M, Pittaluga S, Wlodarska I, Michaux L, Dehaen M, Verhoef G, Thomas J, de Kelder W, Bakker-Schut T, Cassiman JJ, Raap AK, Wolf-Peeters C, Van Den BH, & Hagemeijer A Characteristic pattern of chromosomal gains and losses in marginal zone B cell lymphoma detected by comparative genomic hybridization. *Leukemia* 11: 747-758.1997.
- Drexler HG & MacLeod RA Mantle cell lymphoma-derived cell lines: unique research tools. *Leuk Res* 30: 911-913.2006.
- Dreyling MH, Bullinger L, Ott G, Stilgenbauer S, Muller-Hermelink HK, Bentz M, Hiddemann W, & Dohner H Alterations of the cyclin D1/p16-pRB pathway in mantle cell lymphoma. *Cancer Res* 57: 4608-4614.1997.
- Duggan MJ, Weisenburger DD, Le YL, Bast MA, Pierson JL, Linder J, & Armitage JO Mantle zone lymphoma. A clinicopathologic study of 22 cases. *Cancer* 66: 522-529.1990.
- Durkin SG & Glover TW 2007. Chromosome Fragile Sites. *Annu.Rev.Genet.* (in press).
- Espinete B, Sole F, Pedro C, Garcia M, Bellosillo B, Salido M, Florensa L, Camacho FI, Baro T, Lloreta J, & Serrano S Clonal proliferation of cyclin D1-positive mantle lymphocytes in an asymptomatic patient: an early-stage event in the

- development or an indolent form of a mantle cell lymphoma? *Hum Pathol* 36: 1232-1237.2005.
- Falini B, Pileri S, Zinzani PL, Carbone A, Zagonel V, Wolf-Peeters C, Verhoef G, Menestrina F, Todeschini G, Paulli M, Lazzarino M, Giardini R, Aiello A, Foss HD, Araujo I, Fizzotti M, Pelicci PG, Flenghi L, Martelli MF, & Santucci A ALK+ lymphoma: clinico-pathological findings and outcome. *Blood* 93: 2697-2706.1999.
- Fang NY, Greiner TC, Weisenburger DD, Chan WC, Vose JM, Smith LM, Armitage JO, Mayer RA, Pike BL, Collins FS, & Hacia JG Oligonucleotide microarrays demonstrate the highest frequency of ATM mutations in the mantle cell subtype of lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 5372-5377.2003.
- Fernandez V, Hartmann E, Ott G, Campo E, & Rosenwald A Pathogenesis of mantle-cell lymphoma: all oncogenic roads lead to dysregulation of cell cycle and DNA damage response pathways. *J Clin Oncol* 23: 6364-6369.2005.
- Fernandez V, Jares P, Bea S, Salaverria I, Guino E, de Sanjose S, Colomer D, Ott G, Montserrat E, & Campo E Frequent polymorphic changes but not mutations of TRAIL receptors DR4 and DR5 in mantle cell lymphoma and other B-cell lymphoid neoplasms. *Haematologica* 89: 1322-1331.2004.
- Fernandez V, Jares P, Salaverria I, Gine E, Bea S, Aymerich M, Colomer D, Villamor N, Bosch F, Montserrat E, & Campo E Gene expression profile and genomic changes in disease progression of early-stage chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 93: 132-136.2008.
- Ferreri AJ, Campo E, Seymour JF, Willemze R, Ilariucci F, Ambrosetti A, Zucca E, Rossi G, Lopez-Guillermo A, Pavlovsky MA, Geerts ML, Candoni A, Lestani M, Asioli S, Milani M, Piris MA, Pileri S, Facchetti F, Cavalli F, & Ponzoni M Intravascular lymphoma: clinical presentation, natural history, management and prognostic factors in a series of 38 cases, with special emphasis on the 'cutaneous variant'. *Br J Haematol* 127: 173-183.2004.
- Freudenreich CH Chromosome fragility: molecular mechanisms and cellular consequences. *Front Biosci* 12: 4911-4924.2007.
- Fu K, Weisenburger DD, Greiner TC, Dave S, Wright G, Rosenwald A, Chiorazzi M, Iqbal J, Gesk S, Siebert R, De Jong D, Jaffe ES, Wilson WH, Delabie J, Ott G, Dave BJ, Sanger WG, Smith LM, Braziel RM, Muller-Hermelink HK, Campo E, Gascoyne RD, Staudt LM, & Chan WC Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma: a clinicopathological study based on gene expression profiling. *Blood*.2005.
- Garcia JL, Hernandez JM, Gutierrez NC, Flores T, Gonzalez D, Calasanz MJ, Martinez-Climent JA, Piris MA, Lopez-Capitan C, Gonzalez MB, Otero MD, & San Miguel JF Abnormalities on 1q and 7q are associated with poor outcome in sporadic Burkitt's lymphoma. A cytogenetic and comparative genomic hybridization study. *Leukemia* 17: 2016-2024.2003.

- Gascoyne RD, Aoun P, Wu D, Chhanabhai M, Skinnider BF, Greiner TC, Morris SW, Connors JM, Vose JM, Viswanatha DS, Coldman A, & Weisenburger DD Prognostic significance of anaplastic lymphoma kinase (ALK) protein expression in adults with anaplastic large cell lymphoma. *Blood* 93: 3913-3921.1999.
- Gazzo S, de Colella JM, & Callet-Bauchu E Sequential fluorescence in situ hybridisation analysis for cryptic t(11;14)(q13;q32) in mantle cell lymphoma. *Br J Haematol* 134: 452.2006.
- Gazzo S, Felman P, Berger F, Salles G, Magaud JP, & Callet-Bauchu E Atypical cytogenetic presentation of t(11;14) in mantle cell lymphoma. *Haematologica* 90: 1708-1709.2005.
- Gisselsson D Chromosome instability in cancer: how, when, and why? *Adv Cancer Res* 87: 1-29.2003.
- Greiner TC, Dasgupta C, Ho VV, Weisenburger DD, Smith LM, Lynch JC, Vose JM, Fu K, Armitage JO, Brazier RM, Campo E, Delabie J, Gascoyne RD, Jaffe ES, Muller-Hermelink HK, Ott G, Rosenwald A, Staudt LM, Im MY, Karaman MW, Pike BL, Chan WC, & Hacia JG Mutation and genomic deletion status of ataxia telangiectasia mutated (ATM) and p53 confer specific gene expression profiles in mantle cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 2352-2357.2006.
- Greiner TC, Moynihan MJ, Chan WC, Lytle DM, Pedersen A, Anderson JR, & Weisenburger DD p53 mutations in mantle cell lymphoma are associated with variant cytology and predict a poor prognosis. *Blood* 87: 4302-4310.1996.
- Gronbaek K, de Nully Brown P, Moller MB, Nedergaard T, Ralfkiaer E, Moller P, Zeuthen J, & Guldborg P Concurrent disruption of p16INK4a and the ARF-p53 pathway predicts poor prognosis in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia* 14: 1727-1735.2000.
- Gruszka-Westwood AM, Atkinson S, Summersgill BM, Shipley J, Elnenaei MO, Jain P, Hamoudi RA, Kaeda JS, Wotherspoon AC, Matutes E, & Catovsky D Unusual case of leukemic mantle cell lymphoma with amplified CCND1/IGH fusion gene. *Genes Chromosomes Cancer* 33: 206-212.2002.
- Gu J, Huh YO, Jiang F, Caraway NP, Romaguera JE, Zaidi TM, Fernandez RL, Zhang H, Khouri IF, & Katz RL Evaluation of peripheral blood involvement of mantle cell lymphoma by fluorescence in situ hybridization in comparison with immunophenotypic and morphologic findings. *Mod Pathol* 17: 553-560.2004.
- Gutierrez NC, Hernandez JM, Garcia JL, Canizo MC, Gonzalez M, Hernandez J, Gonzalez MB, Garcia-Marcos MA, & San Miguel JF Differences in genetic changes between multiple myeloma and plasma cell leukemia demonstrated by comparative genomic hybridization. *Leukemia* 15: 840-845.2001.
- Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, & Stevenson FK Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94: 1848-1854.1999.

- Harada S, Suzuki R, Uehira K, Yatabe Y, Kagami Y, Ogura M, Suzuki H, Oyama A, Kodera Y, Ueda R, Morishima Y, Nakamura S, & Seto M Molecular and immunological dissection of diffuse large B cell lymphoma: CD5+, and CD5-with CD10+ groups may constitute clinically relevant subtypes. *Leukemia* 13: 1441-1447.1999.
- Heichman KA & Roberts JM Rules to replicate by. *Cell* 79: 557-562.1994.
- Hernandez JM, Garcia JL, Gutierrez NC, Mollejo M, Martinez-Climent JA, Flores T, Gonzalez MB, Piris MA, & San Miguel JF Novel genomic imbalances in B-cell splenic marginal zone lymphomas revealed by comparative genomic hybridization and cytogenetics. *Am J Pathol* 158: 1843-1850.2001.
- Hernandez L, Bea S, Pinyol M, Ott G, Katzenberger T, Rosenwald A, Bosch F, Lopez-Guillermo A, Delabie J, Colomer D, Montserrat E, & Campo E CDK4 and MDM2 gene alterations mainly occur in highly proliferative and aggressive mantle cell lymphomas with wild-type INK4a/ARF locus. *Cancer Res* 65: 2199-2206.2005.
- Hernandez L, Fest T, Cazorla M, Teruya-Feldstein J, Bosch F, Peinado MA, Piris MA, Montserrat E, Cardesa A, Jaffe ES, Campo E, & Raffold M p53 gene mutations and protein overexpression are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas. *Blood* 87: 3351-3359.1996.
- Hernandez L, Hernandez S, Bea S, Pinyol M, Ferrer A, Bosch F, Nadal A, Fernandez PL, Palacin A, Montserrat E, & Campo E c-myc mRNA expression and genomic alterations in mantle cell lymphomas and other nodal non-Hodgkin's lymphomas. *Leukemia* 13: 2087-2093.1999.
- Hirose Y, Aldape K, Takahashi M, Berger MS, & Feuerstein BG Tissue microdissection and degenerate oligonucleotide primed-polymerase chain reaction (DOP-PCR) is an effective method to analyze genetic aberrations in invasive tumors. *J Mol Diagn* 3: 62-67.2001.
- Hunter T & Pines J Cyclins and cancer II: cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* 79: 573-582.1994.
- Hyman E, Kauraniemi P, Hautaniemi S, Wolf M, Mousses S, Rozenblum E, Ringner M, Sauter G, Monni O, Elkahlon A, Kallioniemi OP, & Kallioniemi A Impact of DNA amplification on gene expression patterns in breast cancer. *Cancer Res* 62: 6240-6245.2002.
- ISCN 1995 (1995) *An International System for Human Cytogenetic nomenclature*, S. Karger, Basel.
- ISCN 2005 (2005) *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*, Karger AG, Basel.
- Jaffe,E.S., Harris,N.L., Stein,H., & Vardiman,J.W. (2001) *World Health Organization classification of tumors. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*, IARC Press, Lyon.

- Jarosova M, Papajik T, Holzerova M, Dusek L, Pikalova Z, Lakoma I, Raida L, Faber E, Divoka M, Vlachova S, Prekopova I, Novosadova A, Pospisilova H, & Indrak K High incidence of unbalanced chromosomal changes in mantle cell lymphoma detected by comparative genomic hybridization. *Leuk Lymphoma* 45: 1835-1846.2004.
- Joos S, Otano-Joos MI, Ziegler S, Bruderlein S, du MS, Bentz M, Moller P, & Lichter P Primary mediastinal (thymic) B-cell lymphoma is characterized by gains of chromosomal material including 9p and amplification of the REL gene. *Blood* 87: 1571-1578.1996.
- Jordanova ES, Riemersma SA, Philippo K, Giphart-Gassler M, Schuurin E, & Kluin PM Hemizygous deletions in the HLA region account for loss of heterozygosity in the majority of diffuse large B-cell lymphomas of the testis and the central nervous system. *Genes Chromosomes Cancer* 35: 38-48.2002.
- Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, & Pinkel D Comparative genomic hybridization: a rapid new method for detecting and mapping DNA amplification in tumors. *Semin Cancer Biol* 4: 41-46.1993.
- Karhu R, Knuutila S, Kallioniemi OP, Siltonen S, Aine R, Vilpo L, & Vilpo J Frequent loss of the 11q14-24 region in chronic lymphocytic leukemia: a study by comparative genomic hybridization. *Tampere CLL Group. Genes Chromosomes Cancer* 19: 286-290.1997.
- Karnan S, Tagawa H, Suzuki R, Suguro M, Yamaguchi M, Okamoto M, Morishima Y, Nakamura S, & Seto M Analysis of chromosomal imbalances in de novo CD5-positive diffuse large-B-cell lymphoma detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 39: 77-81.2004.
- Karpova MB, Schoumans J, Blennow E, Ernberg I, Henter JI, Smirnov AF, Nordenskjold M, & Fadeel B Combined spectral karyotyping, comparative genomic hybridization, and in vitro apoptotyping of a panel of Burkitt's lymphoma-derived B cell lines reveals an unexpected complexity of chromosomal aberrations and a recurrence of specific abnormalities in chemoresistant cell lines. *Int J Oncol* 28: 605-617.2006.
- Kirchhoff M, Gerdes T, Maahr J, Rose H, Bentz M, Dohner H, & Lundsteen C Deletions below 10 megabasepairs are detected in comparative genomic hybridization by standard reference intervals. *Genes Chromosomes Cancer* 25: 410-413.1999.
- Kohlhammer H, Schwaenen C, Wessendorf S, Holzmann K, Kestler HA, Kienle D, Barth TF, Moller P, Ott G, Kalla J, Radlwimmer B, Pscherer A, Stilgenbauer S, Dohner H, Lichter P, & Bentz M Genomic DNA-chip hybridization in t(11;14)-positive mantle cell lymphomas shows a high frequency of aberrations and allows a refined characterization of consensus regions. *Blood* 104: 795-801.2004.

- Komatsu H, Lida S, Yamamoto K, Mikuni C, Nitta M, Takahashi T, Ueda R, & Seto M A variant chromosome translocation at 11q13 identifying PRAD1/Cyclin D1 as the bcl-1 gene. *Blood* 84: 1226-1231.1994.
- Lai R, McDonnell TJ, O'Connor SL, Medeiros LJ, Oudat R, Keating M, Morgan MB, Curriel TJ, & Ford RJ Establishment and characterization of a new mantle cell lymphoma cell line, Mino. *Leuk Res* 26: 849-855.2002.
- Lamant L, Dastugue N, Pulford K, Delsol G, & Mariame B A new fusion gene TPM3-ALK in anaplastic large cell lymphoma created by a (1;2)(q25;p23) translocation. *Blood* 93: 3088-3095.1999.
- Lamant L, de Reynies A, Duplantier MM, Rickman DS, Sabourdy F, Giuriato S, Brugieres L, Gaulard P, Espinos E, & Delsol G Gene-expression profiling of systemic anaplastic large-cell lymphoma reveals differences based on ALK status and two distinct morphologic ALK+ subtypes. *Blood* 109: 2156-2164.2007.
- Lamant L, Gascoyne RD, Duplantier MM, Armstrong F, Raghav A, Chhanabhai M, Rajcan-Separovic E, Raghav J, Delsol G, & Espinos E Non-muscle myosin heavy chain (MYH9): a new partner fused to ALK in anaplastic large cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 37: 427-432.2003.
- Larsen J, Kirchhoff M, Rose H, Gerdes T, Maahr J, Lundsteen C, & Larsen JK Improved sensitivity in comparative genomic hybridization analysis of DNA heteroploid cell mixtures after pre-enrichment of subpopulations by fluorescence activated cell sorting. *Anal Cell Pathol* 19: 119-124.1999.
- Lestou VS, Gascoyne RD, Sehn L, Ludkovski O, Chhanabhai M, Klasa RJ, Husson H, Freedman AS, Connors JM, & Horsman DE Multicolour fluorescence in situ hybridization analysis of t(14;18)-positive follicular lymphoma and correlation with gene expression data and clinical outcome. *Br J Haematol* 122: 745-759.2003.
- Lin K, Sherrington PD, Dennis M, Matrai Z, Cawley JC, & Pettitt AR Relationship between p53 dysfunction, CD38 expression, and IgV(H) mutation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 100: 1404-1409.2002.
- Lones MA, Sanger WG, Le Beau MM, Heerema NA, Sposto R, Perkins SL, Buckley J, Kadin ME, Kjeldsberg CR, Meadows A, Siegel S, Finlay J, Bergeron S, & Cairo MS Chromosome abnormalities may correlate with prognosis in Burkitt/Burkitt-like lymphomas of children and adolescents: a report from Children's Cancer Group Study CCG-E08. *J Pediatr Hematol Oncol* 26: 169-178.2004.
- Ma Z, Cools J, Marynen P, Cui X, Siebert R, Gesk S, Schlegelberger B, Peeters B, Wolf-Peeters C, Wlodarska I, & Morris SW Inv(2)(p23q35) in anaplastic large-cell lymphoma induces constitutive anaplastic lymphoma kinase (ALK) tyrosine kinase activation by fusion to ATIC, an enzyme involved in purine nucleotide biosynthesis. *Blood* 95: 2144-2149.2000.

- Macpherson N, Lesack D, Klasa R, Horsman D, Connors JM, Barnett M, & Gascoyne RD Small noncleaved, non-Burkitt's (Burkit-Like) lymphoma: cytogenetics predict outcome and reflect clinical presentation. *J Clin Oncol* 17: 1558-1567.1999.
- Maravelaki S, Burford A, Wotherspoon A, Joshi R, Matutes E, Catovsky D, & Brito-Babapulle V Molecular cytogenetic study of a mantle cell lymphoma with a complex translocation involving the CCND1 (11q13) region. *Cancer Genet Cytogenet* 154: 67-71.2004.
- Martinez-Climent JA, Vizcarra E, Sanchez D, Blesa D, Marugan I, Benet I, Sole F, Rubio-Moscardo F, Terol MJ, Climent J, Sarsotti E, Tormo M, Andreu E, Salido M, Ruiz MA, Prosper F, Siebert R, Dyer MJ, & Garcia-Conde J Loss of a novel tumor suppressor gene locus at chromosome 8p is associated with leukemic mantle cell lymphoma. *Blood* 98: 3479-3482.2001.
- Matutes E, Parry-Jones N, Brito-Babapulle V, Wotherspoon A, Morilla R, Atkinson S, Elnenaï MO, Jain P, Giustolisi GM, A'Hern RP, & Catovsky D The leukemic presentation of mantle-cell lymphoma: disease features and prognostic factors in 58 patients. *Leuk Lymphoma* 45: 2007-2015.2004.
- Mei R, Galipeau PC, Prass C, Berno A, Ghandour G, Patil N, Wolff RK, Chee MS, Reid BJ, & Lockhart DJ Genome-wide detection of allelic imbalance using human SNPs and high-density DNA arrays. *Genome Res* 10: 1126-1137.2000.
- Mollejo M, Camacho FI, Algara P, Ruiz-Ballesteros E, Garcia JF, & Piris MA Nodal and splenic marginal zone B cell lymphomas. *Hematol Oncol* 23: 108-118.2005.
- Monni O, Joensuu H, Franssila K, & Knuutila S DNA copy number changes in diffuse large B-cell lymphoma--comparative genomic hybridization study. *Blood* 87: 5269-5278.1996.
- Monni O, Oinonen R, Elonen E, Franssila K, Teerenhovi L, Joensuu H, & Knuutila S Gain of 3q and deletion of 11q22 are frequent aberrations in mantle cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 21: 298-307.1998.
- Muller S, Rocchi M, Ferguson-Smith MA, & Wienberg J Toward a multicolor chromosome bar code for the entire human karyotype by fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet* 100: 271-278.1997.
- Nagele RG, Freeman T, McMorrow L, Thomson Z, Kitson-Wind K, & Lee H Chromosomes exhibit preferential positioning in nuclei of quiescent human cells. *J Cell Sci* 112 (Pt 4): 525-535.1999.
- Nanjangud G, Rao PH, Teruya-Feldstein J, Donnelly G, Qin J, Mehra S, Jhanwar SC, Zelenetz AD, & Chaganti RS Molecular cytogenetic analysis of follicular lymphoma (FL) provides detailed characterization of chromosomal instability associated with the t(14;18)(q32;q21) positive and negative subsets and histologic progression. *Cytogenet Genome Res* 118: 337-344.2007.

- Nodit L, Bahler DW, Jacobs SA, Locker J, & Swerdlow SH Indolent mantle cell lymphoma with nodal involvement and mutated immunoglobulin heavy chain genes. *Hum Pathol* 34: 1030-1034.2003.
- O'Connor SJ, Su'ut L, Morgan GJ, & Jack AS The relationship between typical and atypical B-cell chronic lymphocytic leukemia. A comparative genomic hybridization-based study. *Am J Clin Pathol* 114: 448-458.2000.
- Onciu M, Schlette E, Zhou Y, Raimondi SC, Giles FJ, Kantarjian HM, Medeiros LJ, Ribeiro RC, Pui CH, & Sandlund JT Secondary chromosomal abnormalities predict outcome in pediatric and adult high-stage Burkitt lymphoma. *Cancer* 107: 1084-1092.2006.
- Orchard J, Garand R, Davis Z, Babbage G, Sahota S, Matutes E, Catovsky D, Thomas PW, Avet-Loiseau H, & Oscier D A subset of t(11;14) lymphoma with mantle cell features displays mutated IgVH genes and includes patients with good prognosis, nonnodal disease. *Blood* 101: 4975-4981.2003.
- Ott G, Kalla J, Ott MM, Schryen B, Katzenberger T, Muller JG, & Muller-Hermelink HK Blastoid variants of mantle cell lymphoma: frequent bcl-1 rearrangements at the major translocation cluster region and tetraploid chromosome clones. *Blood* 89: 1421-1429.1997.
- Paulovich AG, Toczyski DP, & Hartwell LH When checkpoints fail. *Cell* 88: 315-321.1997.
- Pienkowska-Grela B, Witkowska A, Grygalewicz B, Rymkiewicz G, Rygier J, Woroniecka R, & Walewski J Frequent aberrations of chromosome 8 in aggressive B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet* 156: 114-121.2005.
- Pines J Cell cycle: reaching for a role for the Cks proteins. *Curr Biol* 6: 1399-1402.1996.
- Pinyol M, Bea S, Pla L, Ribrag V, Bosq J, Rosenwald A, Campo E, & Jares P Inactivation of RB1 in mantle-cell lymphoma detected by nonsense-mediated mRNA decay pathway inhibition and microarray analysis. *Blood* 109: 5422-5429.2007.
- Pinyol M, Cobo F, Bea S, Jares P, Nayach I, Fernandez PL, Montserrat E, Cardesa A, & Campo E p16(INK4a) gene inactivation by deletions, mutations, and hypermethylation is associated with transformed and aggressive variants of non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 91: 2977-2984.1998.
- Pinyol M, Hernandez L, Cazorla M, Balbin M, Jares P, Fernandez PL, Montserrat E, Cardesa A, Lopez-Otin C, & Campo E Deletions and loss of expression of p16INK4a and p21Waf1 genes are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas. *Blood* 89: 272-280.1997.
- Pinyol M, Hernandez L, Martinez A, Cobo F, Hernandez S, Bea S, Lopez-Guillermo A, Nayach I, Palacin A, Nadal A, Fernandez PL, Montserrat E, Cardesa A, & Campo E INK4a/ARF locus alterations in human non-Hodgkin's lymphomas

- mainly occur in tumors with wild-type p53 gene. *Am J Pathol* 156: 1987-1996.2000.
- Pinyol M, Salaverria I, Bea S, Fernandez V, Colomo L, Campo E, & Jares P
Unbalanced expression of licensing DNA replication factors occurs in a subset of mantle cell lymphomas with genomic instability. *Int J Cancer* 119: 2768-2774.2006.
- Pittaluga S, Verhoef G, Criel A, Maes A, Nuyts J, Boogaerts M, & De Wolf Peeters C
Prognostic significance of bone marrow trephine and peripheral blood smears in 55 patients with mantle cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 21: 115-125.1996.
- Pollack JR, Sorlie T, Perou CM, Rees CA, Jeffrey SS, Lonning PE, Tibshirani R, Botstein D, Borresen-Dale AL, & Brown PO
Microarray analysis reveals a major direct role of DNA copy number alteration in the transcriptional program of human breast tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 12963-12968.2002.
- Rimokh R, Berger F, Bastard C, Klein B, French M, Archimbaud E, Rouault JP, Santa LB, Duret L, Vuillaume M, & .
Rearrangement of CCND1 (BCL1/PRAD1) 3' untranslated region in mantle-cell lymphomas and t(11q13)-associated leukemias. *Blood* 83: 3689-3696.1994.
- Rimsza LM, Roberts RA, Campo E, Grogan TM, Bea S, Salaverria I, Zettl A, Rosenwald A, Ott G, Muller-Hermelink HK, Delabie J, Fisher RI, Unger JM, LeBlanc M, Staudt LM, Jaffe ES, Gascoyne RD, Chan WC, Weisenburger DD, Greiner T, Braziel RM, & Miller TP
Loss of major histocompatibility class II expression in non-immune-privileged site diffuse large B-cell lymphoma is highly coordinated and not due to chromosomal deletions. *Blood* 107: 1101-1107.2006.
- Rimsza LM, Roberts RA, Miller TP, Unger JM, LeBlanc M, Braziel RM, Weisenberger DD, Chan WC, Muller-Hermelink HK, Jaffe ES, Gascoyne RD, Campo E, Fuchs DA, Spier CM, Fisher RI, Delabie J, Rosenwald A, Staudt LM, & Grogan TM
Loss of MHC class II gene and protein expression in diffuse large B-cell lymphoma is related to decreased tumor immunosurveillance and poor patient survival regardless of other prognostic factors: a follow-up study from the Leukemia and Lymphoma Molecular Profiling Project. *Blood* 103: 4251-4258.2004.
- Rinaldi A, Kwee I, Tadorelli M, Largo C, Uccella S, Martin V, Poretti G, Gaidano G, Calabrese G, Martinelli G, Baldini L, Pruneri G, Capella C, Zucca E, Cotter FE, Cigudosa JC, Catapano CV, Tibiletti MG, & Bertoni F
Genomic and expression profiling identifies the B-cell associated tyrosine kinase Syk as a possible therapeutic target in mantle cell lymphoma. *Br J Haematol* 132: 303-316.2006.
- Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fisher RI, Gascoyne RD, Muller-Hermelink HK, Smeland EB, Giltnane JM, Hurt EM, Zhao H, Averett L, Yang L, Wilson WH, Jaffe ES, Simon R, Klausner RD, Powell J, Duffey PL, Longo DL, Greiner TC, Weisenburger DD, Sanger WG, Dave BJ, Lynch JC, Vose J, Armitage JO, Montserrat E, Lopez-Guillermo A, Grogan TM, Miller TP, LeBlanc M, Ott G, Kvaloy S, Delabie J, Holte H, Krajci P, Stokke T, & Staudt

- LM The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 346: 1937-1947.2002.
- Rosenwald A, Wright G, Leroy K, Yu X, Gaulard P, Gascoyne RD, Chan WC, Zhao T, Haioun C, Greiner TC, Weisenburger DD, Lynch JC, Vose J, Armitage JO, Smeland EB, Kvaloy S, Holte H, Delabie J, Campo E, Montserrat E, Lopez-Guillermo A, Ott G, Muller-Hermelink HK, Connors JM, Braziel R, Grogan TM, Fisher RI, Miller TP, LeBlanc M, Chiorazzi M, Zhao H, Yang L, Powell J, Wilson WH, Jaffe ES, Simon R, Klausner RD, & Staudt LM Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. *J Exp Med* 198: 851-862.2003a.
- Rosenwald A, Wright G, Wiestner A, Chan WC, Connors JM, Campo E, Gascoyne RD, Grogan TM, Muller-Hermelink HK, Smeland EB, Chiorazzi M, Giltnane JM, Hurt EM, Zhao H, Averett L, Henrickson S, Yang L, Powell J, Wilson WH, Jaffe ES, Simon R, Klausner RD, Montserrat E, Bosch F, Greiner TC, Weisenburger DD, Sanger WG, Dave BJ, Lynch JC, Vose J, Armitage JO, Fisher RI, Miller TP, LeBlanc M, Ott G, Kvaloy S, Holte H, Delabie J, & Staudt LM The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma. *Cancer Cell* 3: 185-197.2003b.
- Rubio-Moscardo F, Climent J, Siebert R, Piris MA, Martin-Subero JI, Nielander I, Garcia-Conde J, Dyer MJ, Terol MJ, Pinkel D, & Martinez-Climent JA Mantle-cell lymphoma genotypes identified with CGH to BAC microarrays define a leukemic subgroup of disease and predict patient outcome. *Blood* 105: 4445-4454.2005.
- Sachs RK, Chen AM, & Brenner DJ Review: proximity effects in the production of chromosome aberrations by ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 71: 1-19.1997.
- Salaverria I, Bea S, Lopez-Guillermo A, Lespinet V, Pinyol M, Burkhardt B, Lamant L, Zettl A, Horsman DE, Gascoyne RD, Ott G, Siebert R, Delsol G, & Campo E 2008. Genomic Profiling reveals different genetic aberration in systemic ALK-positive and ALK-negative Anaplastic Large Cell Lymphomas . *Br J Haematol.* (in press).
- Salaverria I, Perez-Galan P, Colomer D, & Campo E Mantle cell lymphoma: from pathology and molecular pathogenesis to new therapeutic perspectives. *Haematologica* 91: 11-16.2006.
- Samaha H, Dumontet C, Ketterer N, Moullet I, Thieblemont C, Bouafia F, Callet-Bauchu E, Felman P, Berger F, Salles G, & Coiffier B Mantle cell lymphoma: a retrospective study of 121 cases. *Leukemia* 12: 1281-1287.1998.
- Savage KJ, Monti S, Kutok JL, Cattoretti G, Neuberg D, De Leval L, Kurtin P, Dal Cin P, Ladd C, Feuerhake F, Aguiar RC, Li S, Salles G, Berger F, Jing W, Pinkus GS, Habermann T, Dalla-Favera R, Harris NL, Aster JC, Golub TR, & Shipp MA The molecular signature of mediastinal large B-cell lymphoma differs from

- that of other diffuse large B-cell lymphomas and shares features with classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 102: 3871-3879.2003.
- Schaffner C, Idler I, Stilgenbauer S, Dohner H, & Lichter P Mantle cell lymphoma is characterized by inactivation of the ATM gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 2773-2778.2000.
- Schlette E, Lai R, Onciu M, Doherty D, Bueso-Ramos C, & Medeiros LJ Leukemic mantle cell lymphoma: clinical and pathologic spectrum of twenty-three cases. *Mod Pathol* 14: 1133-1140.2001.
- Schraders M, Pfundt R, Straatman HM, Janssen IM, van Kessel AG, Schoenmakers EF, van Krieken JH, & Groenen PJ Novel chromosomal imbalances in mantle cell lymphoma detected by genome-wide array-based comparative genomic hybridization. *Blood* 105: 1686-1693.2005.
- Schrock E, du MS, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, & Ried T Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 273: 494-497.1996.
- Seto M, Yamamoto K, Iida S, Akao Y, Utsumi KR, Kubonishi I, Miyoshi I, Ohtsuki T, Yawata Y, Namba M, & . Gene rearrangement and overexpression of PRAD1 in lymphoid malignancy with t(11;14)(q13;q32) translocation. *Oncogene* 7: 1401-1406.1992.
- Sherr CJ Cancer cell cycles. *Science* 274: 1672-1677.1996.
- Shiota M, Nakamura S, Ichinohasama R, Abe M, Akagi T, Takeshita M, Mori N, Fujimoto J, Miyauchi J, Mikata A, Nanba K, Takami T, Yamabe H, Takano Y, Izumo T, Nagatani T, Mohri N, Nasu K, Satoh H, Katano H, Fujimoto J, Yamamoto T, & Mori S Anaplastic large cell lymphomas expressing the novel chimeric protein p80NPM/ALK: a distinct clinicopathologic entity. *Blood* 86: 1954-1960.1995.
- Smith DI, McAvoy S, Zhu Y, & Perez DS Large common fragile site genes and cancer. *Semin Cancer Biol* 17: 31-41.2007.
- Solomon DA, Wang Y, Fox SR, Lambeck TC, Giesting S, Lan Z, Senderowicz AM, Conti CJ, & Knudsen ES Cyclin D1 splice variants. Differential effects on localization, RB phosphorylation, and cellular transformation. *J Biol Chem* 278: 30339-30347.2003.
- Speicher MR, Gwyn BS, & Ward DC Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* 12: 368-375.1996.
- Stilgenbauer S, Bullinger L, Lichter P, & Dohner H Genetics of chronic lymphocytic leukemia: genomic aberrations and V(H) gene mutation status in pathogenesis and clinical course. *Leukemia* 16: 993-1007.2002.
- Sumner AT, de la TJ, & Stuppia L The distribution of genes on chromosomes: a cytological approach. *J Mol Evol* 37: 117-122.1993.

- Suzuki R, Kagami Y, Takeuchi K, Kami M, Okamoto M, Ichinohasama R, Mori N, Kojima M, Yoshino T, Yamabe H, Shiota M, Mori S, Ogura M, Hamajima N, Seto M, Suchi T, Morishima Y, & Nakamura S Prognostic significance of CD56 expression for ALK-positive and ALK-negative anaplastic large-cell lymphoma of T/null cell phenotype. *Blood* 96: 2993-3000.2000.
- Swerdlow SH & Williams ME Centrocytic lymphoma: A distinct clinicopathologic, immunophenotypic, and genotypic entity. *Pathology Annual* 28 (Part 2): 171-197.1993.
- Swerdlow SH & Williams ME From centrocytic to mantle cell lymphoma: a clinicopathologic and molecular review of 3 decades. *Hum Pathol* 33: 7-20.2002.
- Tagawa H, Karnan S, Suzuki R, Matsuo K, Zhang X, Ota A, Morishima Y, Nakamura S, & Seto M Genome-wide array-based CGH for mantle cell lymphoma: identification of homozygous deletions of the proapoptotic gene BIM. *Oncogene* 24: 1348-1358.2005.
- Tanke HJ, Wiegant J, van Gijlswijk RP, Bezrookove V, Pattenier H, Heetebrij RJ, Talman EG, Raap AK, & Vrolijk J New strategy for multi-colour fluorescence in situ hybridisation: COBRA: COMbined Binary RATIO labelling. *Eur J Hum Genet* 7: 2-11.1999.
- Tiemann M, Schrader C, Klapper W, Dreyling MH, Campo E, Norton A, Berger F, Kluin P, Ott G, Pileri S, Pedrinis E, Feller AC, Merz H, Janssen D, Hansmann ML, Krieken H, Moller P, Stein H, Unterhalt M, Hiddemann W, & Parwaresch R Histopathology, cell proliferation indices and clinical outcome in 304 patients with mantle cell lymphoma (MCL): a clinicopathological study from the European MCL Network. *Br J Haematol* 131: 29-38.2005.
- Tort F, Campo E, Pohlman B, & Hsi E Heterogeneity of genomic breakpoints in MSN-ALK translocations in anaplastic large cell lymphoma. *Hum Pathol* 35: 1038-1041.2004.
- Tort F, Hernandez S, Bea S, Camacho E, Fernandez V, Esteller M, Fraga MF, Burek C, Rosenwald A, Hernandez L, & Campo E Checkpoint kinase 1 (CHK1) protein and mRNA expression is downregulated in aggressive variants of human lymphoid neoplasms. *Leukemia* 19: 112-117.2005.
- Tort F, Hernandez S, Bea S, Martinez A, Esteller M, Herman JG, Puig X, Camacho E, Sanchez M, Nayach I, Lopez-Guillermo A, Fernandez PL, Colomer D, Hernandez L, & Campo E CHK2-decreased protein expression and infrequent genetic alterations mainly occur in aggressive types of non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 100: 4602-4608.2002.
- Tort F, Pinyol M, Pulford K, Roncador G, Hernandez L, Nayach I, Kluin-Nelemans HC, Kluin P, Touriol C, Delsol G, Mason D, & Campo E Molecular characterization of a new ALK translocation involving moesin (MSN-ALK) in anaplastic large cell lymphoma. *Lab Invest* 81: 419-426.2001.

- Touriol C, Greenland C, Lamant L, Pulford K, Bernard F, Rousset T, Mason DY, & Delsol G Further demonstration of the diversity of chromosomal changes involving 2p23 in ALK-positive lymphoma: 2 cases expressing ALK kinase fused to CLTCL (clathrin chain polypeptide-like). *Blood* 95: 3204-3207.2000.
- Trinei M, Lanfrancone L, Campo E, Pulford K, Mason DY, Pelicci PG, & Falini B A new variant anaplastic lymphoma kinase (ALK)-fusion protein (ATIC-ALK) in a case of ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Cancer Res* 60: 793-798.2000.
- Tsukasaki K, Krebs J, Nagai K, Tomonaga M, Koeffler HP, Bartram CR, & Jauch A Comparative genomic hybridization analysis in adult T-cell leukemia/lymphoma: correlation with clinical course. *Blood* 97: 3875-3881.2001.
- Viardot A, Moller P, Hogel J, Werner K, Mechtersheimer G, Ho AD, Ott G, Barth TF, Siebert R, Gesk S, Schlegelberger B, Dohner H, & Bentz M Clinicopathologic correlations of genomic gains and losses in follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 20: 4523-4530.2002.
- Vizcarra E, Martinez-Climent JA, Benet I, Marugan I, Terol MJ, Prosper F, Marco J, Sanchez D, Ferrandez A, Tormo M, Sarsotti E, Ferrer R, Garcia M, Ortuno F, Montagud M, & Garcia-Conde J Identification of two subgroups of mantle cell leukemia with distinct clinical and biological features. *Hematol J* 2: 234-241.2001.
- Wessendorf S, Schwaenen C, Kohlhammer H, Kienle D, Wrobel G, Barth TF, Nessling M, Moller P, Dohner H, Lichter P, & Bentz M Hidden gene amplifications in aggressive B-cell non-Hodgkin lymphomas detected by microarray-based comparative genomic hybridization. *Oncogene* 22: 1425-1429.2003.
- Wiegant J, Bezroukove V, Rosenberg C, Tanke HJ, Raap AK, Zhang H, Bittner M, Trent JM, & Meltzer P Differentially painting human chromosome arms with combined binary ratio-labeling fluorescence in situ hybridization. *Genome Res* 10: 861-865.2000.
- Wiestner A, Tehrani M, Chiorazzi M, Wright G, Gibellini F, Nakayama K, Liu H, Rosenwald A, Muller-Hermelink HK, Ott G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Vose JM, Armitage JO, Gascoyne RD, Connors JM, Campo E, Montserrat E, Bosch F, Smeland EB, Kvaloy S, Holte H, Delabie J, Fisher RI, Grogan TM, Miller TP, Wilson WH, Jaffe ES, & Staudt LM Point mutations and genomic deletions in Cyclin D1 create stable truncated mRNAs that are associated with increased proliferation rate and shorter survival in mantle cell lymphoma. *Blood*.2007.
- Wlodarska I, Pittaluga S, Hagemeijer A, Wolf-Peeters C, & Van Den BH Secondary chromosome changes in mantle cell lymphoma. *Haematologica* 84: 594-599.1999.

- Wlodarska I, Wolf-Peeters C, Falini B, Verhoef G, Morris SW, Hagemeijer A, & Van Den BH The cryptic inv(2)(p23q35) defines a new molecular genetic subtype of ALK-positive anaplastic large-cell lymphoma. *Blood* 92: 2688-2695.1998.
- Wong KF 11q13 is a cytogenetically promiscuous site in hematologic malignancies. *Cancer Genet Cytogenet* 113: 93-95.1999.
- Wong KF, Chan JK, So JC, & Yu PH Mantle cell lymphoma in leukemic phase: characterization of its broad cytologic spectrum with emphasis on the importance of distinction from other chronic lymphoproliferative disorders. *Cancer* 86: 850-857.1999.
- Zettl A, Rudiger T, Konrad MA, Chott A, Simonitsch-Klupp I, Sonnen R, Muller-Hermelink HK, & Ott G Genomic profiling of peripheral T-cell lymphoma, unspecified, and anaplastic large T-cell lymphoma delineates novel recurrent chromosomal alterations. *Am J Pathol* 164: 1837-1848.2004.
- Zhang X, Karnan S, Tagawa H, Suzuki R, Tsuzuki S, Hosokawa Y, Morishima Y, Nakamura S, & Seto M Comparison of genetic aberrations in CD10+ diffused large B-cell lymphoma and follicular lymphoma by comparative genomic hybridization and tissue-fluorescence in situ hybridization. *Cancer Sci* 95: 809-814.2004.

GLOSSARI DE CONCEPTES I ANGLICISMES

Per ordre d'aparició:

-
- ¹ **Fol·licle primari** : Nòdul de teixit limfàtic ric en cèl·lules B. Quan són estimulats antigènicaament reben el nom de fol·licles secundaris.
- ² **Helper**: Adjectiu anglès d'ús freqüent que s'utilitza per a designar el limfòcit T cooperador.
- ³ **Limfadenopatia**: Engruiximent anormal dels ganglis limfàtics. Pot acompanyar-se de dolor i augment de la consistència.
- ⁴ **Centròmer**: És la regió de constricció primària en els cromosomes humans; a ell s'uneixen proteïnes que s'uneixen al fus mitòtic durant la divisió cel·lular.
- ⁵ **Banda**: Definim banda com una part del cromosoma que es distingeix clarament dels segments adjacents
- ⁶ **No-disjunció mitòtica**: Fenomen de mala segregació dels cromosomes durant la mitosi.
- ⁷ **Splicing**: Anglisme utilitzat en genètica per a explicar la modicicació que pateix el material genètic en eliminar-se el introns i unir-se el exons del pre mRNA.
- ⁸ **Recombinació mitòtica**: és qualsevol procés que genera una cèl·lula diploide amb una combinació d'al·lels diferent de la que hi havia a la cèl·lula diploide parental.
- ⁹ **Placa metafàsica**: Pla imaginari que forma un angle recte amb el fus mitòtic i és equidistant a tots dos pols. És el plà en el que es situen els cromosomes en la metafase.
- ¹⁰ **Checkpoint**: anglisme utilitzat per descriure els punts de control del cicle cel·lular.
- ¹¹ **Dalton (Da)**: Unitat de massa atòmica. Com les proteïnes acostumen a ser molècules llargues ens referim a elles en KDaltons.
- ¹² **PSTAIRE**: Seqüència altament conservada en CDKs amb estructura tridimensional en hèlix. Glu-Gly-Val-Pro-Ser-Thr-Ala-Ile-Arg-Glu-Ile-Ser-Leu-Leu-Lys-Glu
- ¹³ **Cyclin box**: Anglisme per anomenar a la regió d'homologia entre ciclins.

-
- ¹⁴ **Angiogènesi:** La angiogènesi és un procés fisiològic que consisteix en la formació de vasos sanguinis nous a partir de vasos pre-existents.
- ¹⁵ ***Pocket protein:*** De l'anglès, proteïna butxaca, família de proteïnes reguladores d'E2F.
- ¹⁶ ***Schizosaccharomyces pombe:*** és un fong unicel·lular que es divideix per fisió binària produïnt dues cèl·lules d'igual tamany. És utilitzat com organisme model en estudis de cicle cel·lular.
- ¹⁷ ***Downstream:*** Anglisme utilitzat per a marcar l'ordre temporal dins dels processos moleculars i cel·lulars. Significa que es troba "per sota" dins la via en qüestió.
- ¹⁸ **Nombre modal (NM):** Nombre de cromosomes més comú en una població de cèl·lules estudiades per citogenètica. El nombre modal en una cèl·lules no alterades és 46.
- ¹⁹ **Alteració no-clonal:** Alteració cromosòmica que es dona únicament en una cèl·lula d'una població cel·lular.
- ²⁰ **Microsatèl·lit:** Són petites regions de DNA que contenen múltiples còpies de seqüències repetitives curtes i que s'utilitzen com a marcadors genètics.
- ²¹ ***Hot spots:*** de l'anglès "punt calent". En biologia serveix per definir determinats punts del DNA amb certa susceptivilitat a partir algun tipus d'alteració de la seva estructura, ja siguin mutacions, delecions o reorganitzacions.
- ²² **Mitogen:** Factor de transcripció que actua en el cicle cel·lular estimulant la seva divisió.
- ²³ ***Partner:*** Anglisme utilitzat en genètica per a designar als dos gens que es troben implicats en una translocació equilibrada.

-
- ²⁴ **Gibó (*Hylobates syndactylus*):** Nom donat als primats antropomorfs de la família dels pòngids, els més petits i baixos, amb braços llargs, quasi el doble les cames. Es tracta de l'únic antropoid capaç de caminar únicament amb les extremitats posteriors.
- ²⁵ **Bacterial Artificial Chromosome (BAC):** Vector utilitzat per clonar fragments de DNA. La mida del fragment insertat és troba entre 100- a 300kb.
- ²⁶ **Polimerase chain reaction:** La reacció en cadena de la polimerasa, coneguda com a PCR és una tècnica molecular descrita al 1986 per Kary Mullis que té com a objectiu obtenir un gran nombre de còpies d'un fragment de DNA partint d'un material mínim (1 còpia).
- ²⁷ **Receptor antigènic de cèl·lula T (TCR):** Les cèl·lules T expressen un receptor antigènic clonal antígen-específic. El TCR està format per 2 cadenes polipeptídiques aparellades que presenten porcions variables i invariables amb dominis immunoglobulina-“like” i monovalents.
- ²⁸ **Centroblast-like:** Terme anglès per definir cèl·lules amb aparença semblant a un centroblast.
- ²⁹ **Centròcit:** Limfòcit de petites dimensions que no prolifera, derivat del centroblast i localitzat a la zona clara del centre germinal.
- ³⁰ **Centroblast:** Limfòcit B de grans dimensions localitzat a la zona fosca del centre germinal durant la resposta immunitària.
- ³¹ **Immunoblast:** Limfòcit B activat antigènicament.
- ³² **Estadi de l'extensió tumoral:** Els tumors són classificats en diferents estadis en funció de l'extensió tumoral que presenten. La gradació és del I al IV.
- ³³ **Hepatoesplenomegalia:** Augment de la mida de la melsa i el fetge per sobre dels límits normals.

³⁴ **Cluster:** Terme anglès utilitzat en molts camps per a definir a un grup. En biologia s'utilitza de forma comú per designar grups de gens que es transcriuen a la vegada i que poden estar funcionalment relacionats.

³⁵ **Codó stop:** Un codo stop és una combinació de tres bases que codifica per un aminoàcid que para la fase d'elongació d'una proteïna. Els codons stop poden ser TGA, TAG, i TAA.

³⁶ **Seqüència PEST:** Regió rica en aminoàcids prolina (P), acid glutàmic (E), serina (S) i Treonina (T) que està associada a una ràpida degradació de les proteïnes.

³⁷ **Index mitòtic:** Nombre de mitosi observades a gran resolució en l'examinació microscòpica del tumor.

³⁸ **Burkitt Lymphoma-like:** Terme per a definir a casos de limfoma amb unes característiques molt similars al BL però amb morfologia nuclear diferent. En l'actualitat reben també el nom de BL atípic.

³⁹ **Pro-limfòcit:** És un limfoblast que ha entrat en contacte amb l'antigen, és considerat el precursor immediat del limfòcit.

⁴⁰ **Class switching:** Mecanisme biològic que fa que un anticòs canviï d'una classe a una altre, per exemple de l'isotip IgM a l'isotip IgG.

⁴¹ **MicroRNAs:** Els microRNAs són una sèrie de petits RNAs no codificants que regulen post-transcripcionalment una sèrie de transcrits diana. S'han descrit canvis de la seva expressió relacionades amb alteracions genètiques o epigenètiques, tenint aquests canvis d'expressió possibles papers en el desenvolupament del càncer.

⁴² **Non sense mediated decay pathway:** Mecanisme de supervivència de la cèl·lula eucariota que assegura una ràpida degradació dels transcrits de mRNA que contenen codons de stop prematurs.

-
- ⁴³ **Família Polycomb:** Família de proteïnes que actua associant-se a la cromatina i alterant la seva estructura per tal de promoure l'expressió de gens homeòtics.
- ⁴⁴ **Domini PIK3:** Domini catalític de la família de proteïnes fosfatidilinositol-3 quinases el qual presenta gran similitud al domini de les quinases de fosfolípids.
- ⁴⁵ **Nick translation:** Es una tècnica de marcatge molecular en la qual s'utilitza la DNA polimerasa I per substituir alguns dels nucleòtids del DNA pels seus anàlegs marcats, creant d'aquesta manera una seqüència de DNA que pot ser utilitzada com una sonda de marcatge de FISH entre d'altres aplicacions com per exemple la CGH.
- ⁴⁶ **Vortex:** Anglisme utilitzat de forma comú per definir una rotació en espiral d'un líquid en trajectòries de corrent tancades.
- ⁴⁷ **Spin:** Anglisme utilitzat per a definir una centrifugació curta de menys d'un minut.
- ⁴⁸ **Smear:** Patró continu que ofereix un àcid nucleic en córrer per un gel d'electroforesi quan està parcialment fragmentat o degradat.
- ⁴⁹ **Aigua Milli-Q:** Aigua desionitzada que ha estat purificada en un sistema Milli-Q disponible per Millipore Corporation.
- ⁵⁰ ***Drosophila melanogaster:*** Anomenada comunment mosca de la fruita és utilitzada de forma freqüent a l'investigació genètica donat que aproximadament un 61 % dels gens humans que es coneixen tenen la seva contrapartida identificable al codi genètic de *D. melanogaster*.