



Caracterización genética y molecular del linfoma de células del manto y sus implicaciones clínicas

Cristina Royo Moreno

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

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

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



DEPARTAMENTO DE ANATOMIA PATOLÓGICA, FARMACOLOGÍA Y MICROBIOLOGÍA

FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

PROGRAMA DE DOCTORADO
MEDICINA

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y MOLECULAR DEL LINFOMA DE CÉLULAS DEL MANTO Y SUS IMPLICACIONES CLÍNICAS

Tesis presentada por **Cristina Royo Moreno** para optar al título de
Doctora en Medicina

Director: **Prof. Elias Campo Güerri**

Codirectora: **Dra. Sílvia Beà Bobet**

Barcelona, 2012

Los trabajos realizados en esta tesis han recibido la siguiente financiación:

- Instituto de Salud Carlos III, Beca Predoctoral de Formación en Investigación en Salud (PFIS) FI08/00437.
- Ministerio de Ciencia e Innovación, Proyecto SAF 2008-03630 (Dr. Campo).
- Instituto de Salud Carlos III, Proyecto FIS 2008 (PI08/0077, Dra. Beà).
- Red Temática de Investigación Cooperativa de Cáncer (RTICC) RD06/0020/0039 (Dr. Campo).
- Ajuts per donar suport a les activitats dels grups de recerca, Generalitat de Catalunya, 2009SGR00992 (Dr. Campo).
- Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). Unión Europea. “Una manera de hacer Europa”.

Los trabajos de esta tesis han generado las siguientes publicaciones:

- Mozos A*, **Royo C***, Hartmann E, De Jong D, Baró C, Valera A, Fu K, Weisenburger DD, Delabie J, Chuang SS, Jaffe ES, Ruiz-Marcellan C, Dave S, Rimsza L, Braziel R, Gascoyne RD, Solé F, López-Guillermo A, Colomer D, Staudt LM, Rosenwald A, Ott G, Jares P, Campo E. *SOX11 expression is highly specific for mantle cell lymphoma and identifies the cyclin D1-negative subtype*. Haematologica. 2009 Nov;94(11):1555-62. (Journal Impact factor: 6.532)
- Salaverria I*, **Royo C***, Carvajal-Cuenca A, Clot G, Navarro A, Song JY, Woroniecka R, Walewski J, Klapper W, Hartmann EM, Sujovert P, Wlodarska I, Gaulard P, Ott G, Rosenwald A, Quintanilla-Fend L, Harrys NL, Jaffe ES, Siebert R, Campo E, Beà S. *CCND2 rearrangements are an alternative genetic event to CCND1 traslocations in SOX11-positive Mantle Cell Lymphoma*. Accepted in Blood, September 2012. (Journal Impact factor:10.558)
- **Royo C***, Navarro A*, Clot G, Salaverria I, Giné E, Jares P, Colomer D, Wiestner A, Wilson WH, Vegliante MC, Fernandez V, Hartmann EM, Trim N, Erber WN, Swerdlow SH, Klapper W, Dyer MJ, Vargas-Pabón M, Ott G, Rosenwald A, Siebert R, López-Guillermo A, Campo E[#], Beà S[#]. *Non-nodal type of mantle cell lymphoma is a specific biological and clinical subgroup of the disease*. Leukemia. 2012 Aug;26(8):1895-8. (Journal Impact factor: 9.561)
- **Royo C**, Salaverria I, Hartmann EM, Rosenwald A, Campo E, Beà S. *The complex landscape of genetic alterations in mantle cell lymphoma*. Semin Cancer Biol. 2011 Nov;21(5):322-34. Review.

*co-autores

#co-seniors

Los trabajos publicados y colaboraciones asociadas a esta tesis son:

- Fernández V, Salameró O, Espinet B, Solé F, **Royo C**, Navarro A, Camacho F, Beà S, Hartmann E, Amador V, Hernández L, Agostinelli C, Sargent RL, Rozman M, Aymerich M, Colomer D, Villamor N, Swerdlow SH, Pileri SA, Bosch F, Piris MA, Montserrat E, Ott G, Rosenwald A, López-Guillermo A, Jares P, Serrano S, Campo E. *Genomic and gene expression profiling defines indolent forms of mantle cell lymphoma*. *Cancer Res*. 2010 Feb 15;70(4):1408-18. (Journal Impact factor: 8.234)
- Vegliante MC, **Royo C**, Palomero J, Salaverria I, Balint B, Martín-Guerrero I, Agirre X, Lujambio A, Richter J, Xargay-Torrent S, Beà S, Hernandez L, Enjuanes A, Calasanz MJ, Rosenwald A, Ott G, Roman-Gomez J, Prosper F, Esteller M, Jares P, Siebert R, Campo E, Martín-Subero JI, Amador V. *Epigenetic activation of SOX11 in lymphoid neoplasms by histone modifications*. *PLoS One*. 2011;6(6):e21382. (Journal Impact factor: 4.411)
- Navarro A, **Royo C**, Hernández L, Jares P, Campo E. *Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: new perspectives and challenges with clinical implications*. *Semin Hematol*. 2011 Jul;48(3):155-65. Review.
- Carvajal-Cuenca A, Sua LF, Silva NM, Pittaluga S, **Royo C**, Song JY, Sargent RL, Espinet B, Climent F, Jacobs SA, Delabie J, Naresh KN, Bagg A, Brousset P, Warnke RA, Serrano S, Harris NL, Swerdlow SH, Jaffe ES, Campo E. *In situ mantle cell lymphoma: clinical implications of an incidental finding with indolent clinical behavior*. *Haematologica*. 2012 Feb;97(2):270-8. (Journal Impact factor: 6.532)
- Navarro A, Clot G, **Royo C**, Jares P, Hadzidimitriou A, Agathangelidis A, Bikos V, Darzentas N, Papadaki T, Salaverria I, Pinyol P, Puig X, Palomero J, Vegliante M.C, Amador V, Martínez-Trillos A, Stefancikova L, Wiestner A, Wilson W, Pott C, Calazanz MJ, Trim N, Erber W, Sander B, Ott G, Rosenwald A, Colomer D, Giné E, Siebert R, Lopez-Guillermo A, Stamatopoulos K, Beà S[#], Campo E[#]. *Molecular subsets of Mantle cell lymphoma defined by the IGHV mutational status and SOX11 expression have distinct biological and clinical features*. *Cancer Research*. 2012 Aug. (Journal Impact factor: 8.234)

[#]co-seniors

A mis padres

A Esteve

Al pequeño Ferran

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que han estado cerca durante estos años y que con su ayuda, compañía y ejemplo han ayudado a que este proyecto salga adelante. A todos ellos mil gracias.

En primer lugar, no puedo olvidar a mis compañeros de laboratorio, porque son ellos los que más horas al día han pasado conmigo, para lo bueno y para lo menos bueno. Gracias a **Iti** y a **Nica**, porque todo lo que aprendí nada más entrar fue gracias a vosotras, no ha habido CGH ni qPCR que se me resistiera en estos años. A las súper técnicas: **Miriam**, **Sara** y **Noe**, por estar siempre dispuestas a echar una mano, y por compartir vuestras decisiones vitales, que no son pocas, entre cafés. En especial agradecer a **Sara** su excelente organización y su implicación en los distintos proyectos porque haces que trabajar contigo sea muy fácil.

A los veteranos del lab, a **Lluís**, por tener siempre una explicación a cualquier duda, por ser tan puntual y ser el organizador del grupo en todos los eventos. A **Virginia**, por mostrar que es posible hacer malabarismos entre la familia y el trabajo de investigador. A **Iñaki**, por su entusiasmo infinito y tener la capacidad de tener amigos por todas partes. A **Giancarlo**, gracias por tu amabilidad y a la buena compañía que me haces en los ratos que compartimos despacho. A **Maite**, por ser tan enérgica y dejarme su hueco en el mundo de la secuenciación.

A los becarios, a **Alba**, por ser mi acompañante durante todo este viaje, por ser mi fiel compañera de mesa, poyata, aventuras, confidencias. Gracias por tus consejos y compañía. A **Jara** por estar siempre dispuesta a hacer y organizar planes y ser un ejemplo de constancia en el trabajo. También por ser mi diccionario de inglés particular! A **Mariella**, por su amistad, cariño, apoyo y ser un ejemplo de fortaleza personal. Gracias a ti sé cómo es el tiramisú auténtico. A **Robert** por ser un apasionado de la vida, y contagiar esa energía a tu alrededor. A **Guillem**, por tener tanta paciencia y explicarme una y otra vez los distintos test estadísticos y no quejarte ni una sola vez. Al dúo **Ana-Marta**, por aportar el toque internacional al lab y aportar tanta ilusión por la ciencia. A **Carla**, por llenar las esperas de los westerns de anécdotas personales divertidas. También por enseñarme que la ciencia y la pastelería tienen muchos puntos en común! A **Laura Conde**, por compartir tantas charlas y haber demostrado su fortaleza al haber defendido la tesis sin tenerlo nada fácil.

A todo el departamento de genómica. A **Laura**, **Montsina**, que aunque no nos ha tocado trabajar directamente, siempre habéis estado ahí para echar un cable, buscar muestras, además de compartir comidas y fiestas. A **Helen**, por enseñarme que las manualidades forman

parte del trabajo de laboratorio, por encontrar siempre una excusa para planear una fiesta o un encuentro. A **Ana Enjuanes**, por tu amabilidad y demostrar que es posible hacerse un hueco estable en el mundo de la investigación. A **Pedro**, el crack de los arrays y de las nuevas tecnologías, por estar siempre dispuesto a ayudar a pesar del poco tiempo que le dejan las clases, los reviews, etc. A **Magda**, por darme un empujón para escribir la tesis y por tus consejos y buenas lecciones. Ser tan cercana hace que trabajar contigo sea muy reconfortante.

También a los estudiantes que nos han aportado tanto en sus estancias en el lab como **Kouske** (Japón), **Sebastian** y **Jakob** (Holanda), **Nikky** (Inglaterra), y **Lenka** (República Checa) con los que he descubierto distintos aspectos de sus culturas en primera persona además de haberme ayudado a redescubrir Barcelona.

A las chicas del Banco de tumores: **Laura**, **Mónica**, **Ángela**, **Lourdes** y **Raquel**. Por compartir laboratorio, comidas, karaokes, y trabajar con tanta diligencia.

A los compañeros del grupo de **Dolors Colomer**: **Mónica**, **Silvia**, **Laia**, **Gaël** y **Patricia** por colaborar activamente en los seminarios del grupo y compartir congresos y preocupaciones.

A **Ana Carrió** y **Dolors Costa** por acogerme muchas tardes en su laboratorio para cariotipar y ayudarme en mis dudas citogenéticas. A **Candi**, **Sandra** y **Cristina** por ofrecerme su ayuda en todo momento.

A **Armando**, **Eva Giné**, **Gonzalo**, y **Ana Mozos** por aportar el imprescindible enfoque clínico en los trabajos que hemos hecho juntos.

A **Carmen Muro** y **Nathalie**, por los miles de mails que nos cruzamos al día, y preocuparos de que haya dinero para pagarlo todo! Por organizar las becas, que lleguen los pedidos, los viajes, etc. y hacerlo todo súper eficientemente.

A los dos directores de esta tesis, porque gracias a su dedicación y trabajo hemos llegado a concluirla. A mi codirectora **Silvia Beà**, por no perder nunca las ganas de reír aún en los momentos de más estrés! Gracias por preocuparte por mí y ser mi referencia durante todo este tiempo.

Sobre todo a mi director **Elías Campo**, por hacerme un hueco en tu grupo, por tener la capacidad de ser tan brillante en el trabajo y ser aún mejor persona. Gracias por el trato tan humano que siempre me has dado.

Por otro lado quisiera agradecer a toda mi familia por vuestro apoyo y animarme en mis decisiones. A mi **madre** y mi **padre** por apoyarme siempre. Por quererme tanto y alegrarse de los pequeños éxitos de sus hijas. En especial a mi padre, porque aunque nos dejaste en la mitad de mi tesis, sigues estando en silencio dándome fuerzas en los momentos difíciles. A **Pi**, por haber compartido tantas vivencias en nuestro crecimiento y estar siempre presente en la distancia.

No puedo olvidar a mi segunda familia. A **Dolors** por cuidarme tanto. Mi salud alimenticia correría peligro si no fuera por los tupperes que me preparas con tanto cariño. Y por cuidar tanto del pequeño Ferran y permitir que pueda dedicarle más tiempo al trabajo. A **Ferran** por confiar en mí. Por ser el más consciente de que estoy haciendo la tesis. A **Mireia, Ruben y Eric**, por compartir tan buenos ratos y aceptarme enseguida como una más del núcleo familiar.

A la tía **Maite** y al tío **Martín**, por ser tan cercanos y por tener siempre las puertas abiertas de vuestra casa y hacerme sentir tan a gusto! Gracias a **Lourdes**, por la positividad que has aportado siempre a la familia cuando más la necesitábamos.

A **Carola**, gracias por tu amistad, por escucharme y porque siempre es un placer hablar contigo. Gracias por tus consejos y por tu cariño. También a **Ali, Itzi, Chac, Elena, Laurita** y la **Killo**, por vuestra amistad, vuestro apoyo, y por los buenos momentos que pasamos juntas.

En especial a **Esteve**, por cruzarte en mi Camino y ser mi apoyo incondicional. Gracias por tu compañía y tu cariño. Por hacerme reír tanto, ya sabes que soy tu mejor público. Gracias por crear conmigo esta nueva familia y hacerme tan feliz. Y al pequeño **Ferran**, por alegrarme cada día desde que estas aquí y ayudarme a relativizar mis agobios laborales.

Por último, gracias a los que no aparecéis explícitamente pero habéis compartido grandes momentos conmigo, que sin duda han sido de gran ayuda.

ÍNDICE

ABREVIATURAS **1**

INTRODUCCIÓN **7**

1. LAS NEOPLASIAS LINFOIDES **7**

- 1.1. Origen de las neoplasias linfoides **7**
- 1.2. Localización y biología de los tejidos linfoides **8**
- 1.3. Clasificación **9**
- 1.4. Epidemiología y factores de riesgo **14**

2. EL LINFOMA DE CÉLULAS DEL MANTO **17**

- 2.1. Características generales **17**
- 2.2. Alteración genética primaria y sus efectos **19**
 - 2.2.1. Translocación del gen *CCND1* **20**
 - 2.2.2. La ciclina D1 en el ciclo celular **21**
 - 2.2.3. Algunos MCL no sobreexpresan ciclina D1 **23**
- 2.3. Alteraciones genómicas secundarias **25**
- 2.4. Genes diana candidatos en el desarrollo del MCL **26**
- 2.5. Genes y vías metabólicas afectadas por las alteraciones genómicas **33**
 - 2.5.1. El ciclo celular y respuesta al daño del DNA **33**
 - 2.5.2. Otras vías afectadas **34**
- 2.6. Periodo de latencia del MCL y curso clínico indolente **35**
- 2.7. Importancia de *SOX11* como marcador del MCL **38**
 - 2.7.1. Características del gen *SOX11* **38**
- 2.8. Pronóstico del MCL **40**
- 2.9. *SOX11* y pronóstico en MCL **42**
- 2.10. Tratamiento del MCL **42**
- 2.11. Diagnóstico diferencial del MCL **43**

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS **47**

RESULTADOS **51**

- TRABAJO Nº1** **51**

La expresión de SOX11 es altamente específica del linfoma de células del manto e identifica el subtipo ciclina D1 negativo	
TRABAJO Nº2	61
El reordenamiento de <i>CCND2</i> es el evento genético más frecuente en el linfoma de células del manto ciclina D1 negativo	
TRABAJO Nº3	123
El linfoma de células del manto sin afectación ganglionar es un subgrupo clínico y biológico específico de la enfermedad	
REVISIÓN	145
El complejo escenario de las alteraciones genéticas del linfoma de células del manto	
DISCUSIÓN	163
CONCLUSIONES	175
ANEXOS	179
ANEXO 1	179
Genomic and gene expression profiling defines indolent forms of mantle cell lymphoma	
ANEXO 2	180
Epigenetic activation of <i>SOX11</i> in lymphoid neoplasms by histone modifications	
ANEXO 3	181
In situ mantle cell lymphoma: clinical implications of an incidental finding with indolent clinical behavior	
ANEXO 4	182
Molecular subsets of mantle cell lymphoma defined by the <i>IGHV</i> mutational status and <i>SOX11</i> expression have distinct biological and clinical features	
ANEXO 5	183
Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: new perspectives and challenges with clinical implications	
BIBLIOGRAFIA	187
GLOSARIO	205

ABREVIATURAS

A

ABC-DLBCL: linfoma difuso de células grandes del subgrupo molecular de células B activadas (*activated B-cell like*)

ALL: leucemia linfoblástica aguda (*acute lymphoblastic lymphoma*)

B

BAC: cromosoma artificial bacteriano (*bacterial artificial chromosome*)

BL: linfoma de Burkitt (*Burkitt lymphoma*)

C

CCND1: gen ciclina D1

CCND2: gen ciclina D2

CCND3: gen ciclina D3

CCNE: gen de ciclina E

CDKs: quinasas dependientes de ciclina (*cyclin-dependent kinases*)

CGH: hibridación genómica comparada (*comparative genomic hybridization*)

CGH-array: array de CGH

CLL: leucemia linfática crónica (*chronic lymphocytic leukemia*)

CNA: alteración de número de copias (*copy number alteration*)

CNN-LOH: número de copia neutro con pérdida de heterocigosidad (*copy number neutral-loss of heterozygosity*)

CNV: variaciones en número de copia (*copy number variation*)

D

DBN1: gen de drebrin-1 ó developmentally-regulated brain protein 1

DLBCL: linfoma difuso de células B grandes (*diffuse large B-cell lymphoma*)

DNA: ácido desoxribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)

E

EBV: virus de Epstein-Barr (*Epstein-Barr virus*)

ECOG: eastern cooperative oncology group

F

FFPE: tejido fijado con formalina y embebido en parafina (*formalin fixed paraffin embedded tissue*)

FISH: hibridación in situ fluorescente (*fluorescence in situ hybridization*)

FL: linfoma foliular (*follicular lymphoma*)

FLIPI: IPI específico para el linfoma foliular

G

GCB-DLBCL: linfoma difuso de células grandes del subgrupo molecular de células de centro germinal (*germinal center B-cell like*)

GEP arrays: arrays de expresión génica (*gene expression profiling*)

H

HCL: tricoleucemia (*hairy cell leukemia*)

HDGFRP3: gen de *hepatoma derived growth factor related protein 3*

HCV: virus de la hepatitis C (*hepatitis C virus*)

HIV: virus de la inmunodeficiencia humana (*human immunodeficiency virus*)

HMG: *high mobility group*

I

IG: *inmunoglobulinas*

IPI: índice pronóstico internacional (*international prognostic index*)

L

LBL: *lymphoblastic lymphoma*

LPL: linfoma linfoplasmacítico (*lymphoplasmacytic lymphoma*)

LDH: *lactato deshidrogenasa*

M

MALT: linfoma extraganglionar de zona marginal asociado a mucosa (*extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue*)

MAPSs: proteínas asociadas a microtubulos (*microtubule-associated proteins*)

MCL: linfoma de células del manto, (*mantle cell lymphoma*)

MIPI: IPI para el linfoma de células del manto

MM: mieloma múltiple o plasmocitoma (*multiple myeloma or plasma cell myeloma*)

mRNA: *RNA mensajero*

MTC: *major traslocation cluster*

N

NHL: linfoma no Hodgkin (*non-Hodgkin lymphoma*)

NK: *natural killer*

NMZL: linfoma ganglionar de zona marginal (*nodal marginal zone lymphoma*)

O

OMS: *organización mundial de la salud*

P

PAC: cromosoma artificial derivado del bacteriófago P1 (*P1-derived artificial chromosome*)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*polimerase chain reaction*)

PMLBCL: linfoma primario mediastínico de células B grandes (*primary mediastinal large B-cell lymphoma*)

Q

qRT-PCR: PCR cuantitativa a tiempo real (*quantitative real time-PCR*)

R

RNA: ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*)

S

SIDA: síndrome de inmunodeficiencia adquirida

SLL: linfoma linfocítico de célula pequeña (*small lymphocytic lymphoma*)

SMZL: linfoma de zona marginal esplénico (*splenic B-cell marginal zone lymphoma*)

SNP-array: array de polimorfismos de nucleótido único (*single nucleotide polymorphism*)

SOX11: gen de *SRY-related HMG-box gene 11*

SRY: gen de *sex-determining region Y*

SZML: linfoma esplénico de zona marginal (*splenic marginal zone lymphoma*)

T

TGF- β : factor de crecimiento transformante (*transforming growth factor-beta*)

W

WBC: leucocitos (*white blood cell*)

INTRODUCCIÓN

1. LAS NEOPLASIAS LINFOIDES

1.1. Origen de las neoplasias linfoides

Las neoplasias linfoides son un conjunto de enfermedades neoplásicas derivadas de los linfocitos y sus precursores que se desarrollan en los órganos hematopoyéticos y en el sistema linfático. La biología y manifestaciones clínicas de este tipo de enfermedades son muy diversas debido a la gran complejidad celular y funcional de las poblaciones donde se originan, y a los diferentes mecanismos patogénicos que contribuyen a su desarrollo.

Las causas biológicas de la aparición de las neoplasias linfoides son diversas pero generalmente ocurre como en la mayoría de los distintos cánceres, originándose a partir de una sola célula, y la consiguiente acumulación de alteraciones en los genes durante un tiempo hasta que la enfermedad se hace aparente. Durante este proceso dinámico, se seleccionan aquellas células que van adquiriendo alteraciones en su material genético que les proporcionan ventajas en su crecimiento. Estas alteraciones tienen lugar en tres tipos de genes: protooncogenes, genes supresores de tumores y genes de reparación del DNA. Los protooncogenes son en realidad genes normales susceptibles de ser mutados y generar la transformación neoplásica. Cuando ocurre una mutación se convierten en oncogenes. Los genes supresores de tumores, fisiológicamente tienen la función de controlar el ciclo de división celular, evitando el crecimiento excesivo y manteniendo las características de localización de las células. Estos genes pueden inducir procesos neoplásicos cuando al ser inactivados mediante mutación, delección o hipermetilación, dejan de expresarse o producen una proteína no funcional. Finalmente, los genes de reparación del DNA, son los responsables de corregir los errores producidos en la incorporación de nucleótidos durante la replicación del DNA y de reparar las alteraciones inducidas en el DNA. Una mutación en estos genes conduce a la aparición de múltiples mutaciones en el genoma que tendrán efectos cancerígenos cuando impliquen a protooncogenes o a genes supresores de tumores (Muñoz A, 1997).

Es muy frecuente en los linfomas que las alteraciones en los genes que darán lugar a la neoplasia se inicien con una translocación cromosómica primaria. La elevada frecuencia de translocaciones se explica, en parte, por la implicación de los genes de las **inmunoglobulinas (IG)** y el **receptor de célula T (TCR)** en las células B y T, respectivamente. Estos dos genes son los únicos genes humanos que presentan reordenamientos y delecciones durante su maduración normal con el fin de reconocer una variedad casi ilimitada de antígenos. Este

fenómeno fisiológico facilita roturas y reordenamientos con una frecuencia espontánea relativamente elevada. La mayoría de translocaciones en linfomas incluyen estos puntos de rotura en los que un oncogén se queda colocado a continuación de los **loci** *IG* o *TCR*, y queda sometido a la regulación de su **enhancer** y/o **promotor**, resultando en una expresión constitutiva del oncogén translocado. Por ejemplo, en los linfomas de célula B, los genes sobreexpresados de **ciclina** *D1*, *BCL2*, y *MYC*, en las translocaciones t(11;14), t(14;18) y t(8;14), respectivamente, están continuamente transcribiéndose por efecto del enhancer de la cadena pesada de las *IG* (***IGH***) situado en 14q32.

1.2. Localización y biología de los tejidos linfoides

Los tejidos linfoides que forman el sistema inmunitario se dividen en dos grandes grupos según su localización: los órganos linfoides centrales (médula ósea y timo), y los órganos linfoides periféricos (bazo, ganglios linfáticos y tejidos linfoides asociados a mucosas). Los linfocitos tienen su origen en los órganos linfoides centrales a partir de células madre precursoras. En este compartimento se produce el primer paso de diferenciación y reordenamiento de los segmentos V (*variable*), D (*diversity*) y J (*joining*) de los genes de las *IG*. Estos linfocitos se encuentran en estado de reposo y no proliferan, ya que necesitan reaccionar con un antígeno determinado para activarse. Luego migran a los órganos linfoides periféricos y circulan por todo el cuerpo entrando en los folículos linfoides primarios y secundarios, que son compartimentos donde se acumulan las células B. En los folículos linfoides secundarios, los linfocitos tienen la oportunidad de entrar en contacto con antígenos a través de las células presentadoras de antígeno, y así iniciar los procesos de mutación somática (caracterizado por la introducción de mutaciones puntuales, deleciones o duplicaciones en el DNA para generar anticuerpos con gran afinidad por el antígeno) y cambio de isotipo (cambio de la región constante para obtener anticuerpos con distintas funciones efectoras, pero con el mismo sitio de unión al antígeno) para evolucionar a células B efectoras o células B memoria, que una vez activadas abandonan el folículo para dirigirse a la médula ósea donde se transformarán en células plasmáticas productoras de anticuerpos (Jares *et al.*, 2007)(Figura 1).

Los folículos linfoides secundarios constan de tres partes bien diferenciadas: el **centro germinal**, donde las células proliferan después de haberse encontrado con el antígeno; el manto, zona formada por linfocitos maduros predominantemente **naive**, y una región marginal, por la que pasarán las células que posteriormente darán lugar a células B memoria o células plasmáticas (Figura 1).

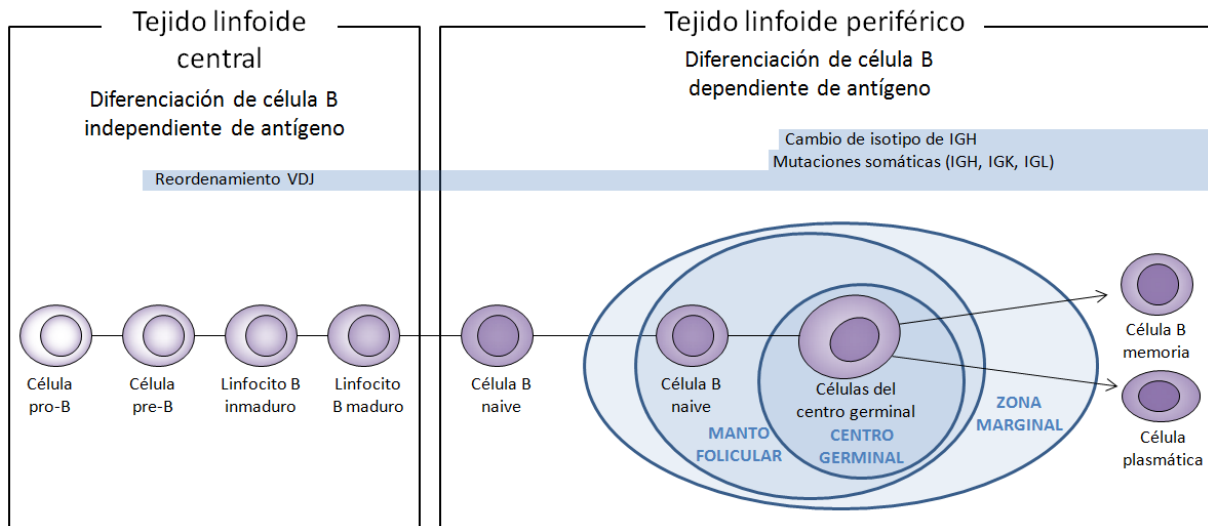


Figura 1. Proceso de diferenciación de las células B.

Las neoplasias linfoides de células B tienden a imitar los estadios de diferenciación normal de la célula B, y su parecido con los estadios celulares normales es la base para su clasificación y nomenclatura. De este modo, los órganos más frecuentemente afectados en estas neoplasias se encuentran principalmente en las regiones linfáticas (ganglios linfáticos, bazo, amígdalas, **anillo de Waldeyer**, apéndice, timo y **placas de Peyer**), aunque también pueden aparecer en regiones extra-linfáticas (pulmones, hueso, hígado, médula ósea, pleura, peritoneo y otros) asociados a procesos inflamatorios crónicos de estos territorios.

1.3. Clasificación

Las neoplasias linfoides se pueden presentar en forma de linfoma (masa sólida de células tumorales), de leucemia (células tumorales en sangre) o de ambos a la vez.

La morfología y el inmunofenotipo son la base para el diagnóstico de la mayoría de las neoplasias linfoides. Sin embargo, no hay ningún marcador único que sea específico de una neoplasia, por tanto, se necesita la combinación de rasgos morfológicos y un panel de marcadores antigénicos para el correcto diagnóstico. De todos modos, dentro de una entidad concreta, existen variaciones en los rasgos inmunofenotípicos. Por esta razón, los estudios moleculares (alteraciones genéticas y de expresión génica) resultan muy útiles para su clasificación.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha elaborado la última y más actualizada clasificación de los linfomas dividiéndolos en neoplasias mieloides, neoplasias linfoides (donde se incluyen las de tipo B, T y NK, en base a la célula de origen), el **linfoma de Hodgkin**, las

enfermedades linfoproliferativas asociadas a inmunodeficiencia y las neoplasias de **células histiocíticas y dendríticas**. Concretamente, dentro de las neoplasias linfoides, las neoplasias de célula B madura son las más frecuentes en la población (90% de los casos) (Swerdlow et al., 2008).

Las neoplasias linfoides de célula B

Dentro de la categoría de neoplasias linfoides de célula B, se reconocen dos grandes grupos: las neoplasias de células precursoras, que corresponden a los estadios más tempranos de diferenciación, y las neoplasias de células maduras diferenciadas. Las más representativas se detallan a continuación (Figura 2).

- Linfomas de células B precursoras
 1. Leucemia/Linfoma linfoblástico (ALL/LBL)
- Linfomas de células B maduras
 2. Leucemia linfática crónica/linfoma linfocítico (CLL/SLL)
 3. Linfoma linfoplasmacítico (LPL)
 4. Linfoma de células del manto (MCL)
 5. Linfoma folicular (FL)
 6. Linfoma difuso de células B grandes (DLBCL)
 7. Linfoma primario mediastínico de células B grandes (PMLBCL)
 8. Linfoma extraganglionar de zona marginal de tejido linfoide asociado a mucosa (MALT)
 9. Linfoma ganglionar de zona marginal (NMZL)
 10. Linfoma de zona marginal esplénico (SMZL)
 11. Linfoma de Burkitt (BL)
 12. Tricoleucemia (HCL)
 13. Plasmocitoma y mieloma múltiple (MM)

1. Linfoma linfoblástico (LBL) y leucemia linfoblástica aguda (ALL)

Es una neoplasia de células linfoides precursoras (linfoblastos) de tipo B. La ALL afecta a sangre periférica y médula ósea principalmente en niños, y el LBL es de afectación extraganglionar en pacientes jóvenes. El 80% de los niños que presentan ALL se curan (Brunning et al., 2001), en cambio, los pacientes con LBL tienen una media de supervivencia de 5 años (Lin et al., 2000). Estas neoplasias no presentan *IG* de superficie y solamente un 10% de los casos muestra IgM en citoplasma.

2. Leucemia linfática crónica/linfoma linfocítico (CLL/SLL)

Es la forma más común de leucemia y aparece en personas mayores (edad media: 65 años). Es una neoplasia de bajo grado caracterizada por la acumulación de células B monoclonales con un fenotipo peculiar que coexpresa **CD5**, **CD23** y **CD43**. Citológicamente, las células son pequeñas, redondeadas, con nucléolo discreto o ausente y poco citoplasma, aunque algunos casos pueden contener el núcleo irregular pudiéndose confundir con el MCL. Existen dos tipos de linfocitos que pueden dar lugar a este tumor, los que no presentan mutaciones de las *IG* y los que sí las presentan al haber pasado por el centro germinal y haber entrado en contacto con un antígeno. Los casos con mutaciones en las *IG* presentan mejor pronóstico (Krober et al., 2002). Además, la expresión baja de las proteínas **CD38** y **ZAP-70** tiene una fuerte correlación con la hipermutación de las *IG* (Crespo et al., 2003). A nivel genético, esta neoplasia presenta pocas alteraciones cromosómicas, que aumentan con la evolución de la enfermedad. Un 5-10% de los casos pueden progresar a un linfoma agresivo (DLBCL), conocido como Síndrome de Richter. Las alteraciones genéticas características de estos tumores son la delección de 13q14 (50%), la trisomía 12 (20%) y con menos frecuencia, las delecciones de 11q22-23, 17p13 y 6q21 (Döner et al., 2000; Kröber et al., 2006).

3. Linfoma linfoplasmacítico (LPL)

Es una neoplasia linfoide de bajo grado que se origina a partir de linfocitos periféricos. Está caracterizada por la proliferación difusa de linfocitos B pequeños (CD5-, **CD10**- y CD23-) con tendencia a diferenciarse a células plasmáticas. Estas células presentan IgM monoclonal citoplasmática, afectación de médula ósea de linfoma de célula pequeña con diferenciación a célula plasmática, y está asociado con la **Macroglobulemia de Waldeström**. Las delecciones de 6q son frecuentes. A pesar de tener un curso clínico predominantemente indolente, algunos casos evolucionan hacia un linfoma más agresivo (DLBCL) (Swerdlow et al., 2008).

4. Linfoma de células del manto (MCL)

Es la neoplasia linfoide en que está centrada esta tesis doctoral y encontramos una explicación extendida en el capítulo 2.

5. Linfoma folicular (FL)

Es un linfoma de bajo grado derivado de células B maduras del centro germinal que han adquirido, en la mayoría de los casos, la translocación t(14;18)(q32;q21) que causa la sobreexpresión del gen *BCL2*, el cual bloquea la apoptosis en las células B del centro germinal. Es una de las formas más comunes de linfoma B en países occidentales. Histológicamente presentan estructuras foliculares de tamaño uniforme y esférico, distribuidas por todo el ganglio linfático. Fenotípicamente expresan IG de superficie, marcadores de línea B (como **CD19**, **CD20** y **CD22**) y los marcadores centrofoliculares, CD10 y BCL6. Algunos pacientes presentan un curso indolente de la enfermedad, mientras que en otros ésta progresa rápidamente debido, en parte, a la acumulación de alteraciones secundarias o por una transformación histológica clínicamente agresiva (DLBCL). Adicionalmente a la translocación

t(14;18), se encuentran otras alteraciones genéticas en el 90% de los FL, incluyendo pérdidas de 1p, 6q, 10q y 17p, y ganancias de los cromosomas 1, 6p, 7, 8, 12q, 18q y el cromosoma X (Leich et al., 2009).

6. Linfoma difuso de células B grandes (DLBCL)

Es el linfoma más común en los países occidentales con una frecuencia de alrededor del 40% de todos los linfomas de célula B. A pesar de ser un linfoma agresivo, muchos casos se curan con las terapias actuales. Sin embargo, como suele ocurrir con los linfomas agresivos, en países subdesarrollados su proporción es aún más elevada y afecta frecuentemente a pacientes con inmunodeficiencias como el Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Los DLBCL son un grupo con una elevada heterogeneidad clínica y biológica. En estudios de *arrays* se han identificado dos grupos basados en el perfil de expresión génica denominados DLBCL de tipo centro germinal GCB-DLBCL, y de tipo célula B activada ABC-DLBCL (Alizadeh et al., 2000), por su similitud con los linfocitos B normales del centro germinal y con células B activadas periféricas, respectivamente. Estos dos grupos están asociados a diferentes alteraciones cromosómicas. El subgrupo ABC-DLBCL tiene frecuentemente ganancias de 3q y 18q, y pérdidas de 6q, mientras que el subgrupo GCB-DLBCL presenta ganancias frecuentes de 2p y 12q (Beà et al., 2005).

7. Linfoma primario mediastínico de células B grandes (PMLBCL)

Es un linfoma difuso de células B grandes que se origina en el mediastino a partir de las células B de origen tímico. Lo padecen principalmente adultos jóvenes, preferentemente de sexo femenino. Inmunohistoquímicamente expresan antígenos B como CD19, CD20 y **CD79a**, y carecen de inmunoglobulinas. Los marcadores **CD30**, **IRF4/MUM1**, y CD23 son positivos. Genéticamente, tienen ganancias de 9p, 2p y del cromosoma X (Beà et al., 2005; Wessendorf et al., 2007).

8. Linfoma extraganglionar de zona marginal de tejido linfoide asociado a mucosa (MALT)

Es un linfoma de bajo grado que tiende a diseminarse de forma lenta. Morfológicamente es heterogéneo y el infiltrado se encuentra en la zona marginal de los folículos reactivos y se extiende por toda la región interfolicular. Normalmente, estos linfomas crecen fuera de los ganglios, particularmente en tejidos linfoides asociados a mucosas, siendo el tracto intestinal la localización más típica de aparición (50%). Las células tumorales expresan CD20, **CD79**, y son negativas para IgM, CD5, CD10 y CD23. La translocación t(11;18)(q21;q21) que fusiona los genes *API2/MALT1* se encuentra en un 25-50%. Otras translocaciones asociadas a los linfomas tipo MALT son t(1;14)(p22;q32), t(14;18)(q32;q21) y la t(3;14)(p14.1;q32), resultando en la desregulación transcripcional de *BCL10*, *MALT1*, *FOXP1*, respectivamente (Ott G et al., 1997; Streubel et al., 2004; Streubel et al., 2005).

9. Linfoma ganglionar de zona marginal (NMZL)

Es un linfoma de bajo grado de tipo B poco frecuente, de predominancia femenina, que tiene su origen en el ganglio linfático, generalmente sin afectación esplénica ni extraganglionar. Citológicamente, las células neoplásicas son de tamaño pequeño y con núcleo redondeado o ligeramente irregular. Las características inmunofenotípicas son similares a los MALT y algunos de ellos son similares a los SMZL. Presenta los marcadores típicos de célula B madura y expresa IgM (Swerdlow et al., 2008).

10. Linfoma esplénico de zona marginal (SMZL)

Este tipo de linfoma se considera de bajo grado y se ha relacionado con la existencia de algunas infecciones, como de del virus de la hepatitis C (HCV), y procesos de autoinmunidad. Es una enfermedad muy poco frecuente que implica la sustitución de la **pulpa blanca** de los centros germinales del bazo por linfocitos B de tamaño pequeño. Presenta afectación en bazo, médula ósea y sangre periférica. Las células tumorales presentan un patrón inmunohistoquímico positivo para CD20, y negativo para CD5, CD10, CD23, CD43 y con expresión de IgM y IgD. Algunos casos presentan delección de 7q (Traverse-Glehen et al., 2008).

11. Linfoma de Burkitt (BL)

Es un linfoma muy agresivo, frecuentemente extraganglionar. Probablemente proviene de células B de la primera reacción del centro germinal (CD10+ y BCL6+). Existen tres variantes con diferentes manifestaciones clínicas, morfológicas y biológicas: el BL endémico (en África tropical y Nueva Guinea asociado al virus del Epstein-Barr (EBV)), el BL esporádico, y el BL asociado a inmunodeficiencia (como el SIDA). El 80% de los casos tienen la t(8;14) y un 20% la t(2;8) o la t(8;22), donde el gen *MYC* (8q24) se ve involucrado en la translocación con los promotores de las *IG heavy* (H), kappa (k), y lambda (λ), respectivamente, resultando en la sobreexpresión de la proteína MYC. Las ganancias más frecuentes son 1q, 7/7q, 8q, 13q y la pérdida más frecuente es 17p (Salaverria et al., 2008b).

12. Tricoleucemia (HCL)

Es una neoplasia de célula B pequeña. Se caracteriza por presentar proyecciones en el citoplasma de las células tumorales. Presenta afectación en sangre, médula ósea y **pulpa roja** del bazo. El patrón inmunofenotípico característico es positividad para **CD103**, CD20, CD22 y **CD11c** y negatividad para CD5, CD10 y CD23. La HCL es una de las neoplasias hematológicas de las que aún no se conoce su correspondencia con una célula B normal en ninguno de sus estadios de diferenciación (Swerdlow et al., 2008).

13. Plasmocitoma y mieloma múltiple (MM)

Es una neoplasia de células plasmáticas con distinto grado de madurez incluyendo variantes atípicas que crecen en la médula ósea. Esta enfermedad abarca un amplio espectro clínico desde formas asintomáticas hasta formas agresivas, debido a la deposición de cadenas anómalas de las inmunoglobulinas en los tejidos, resultando en insuficiencia renal, anemia,

hipercalcemia y frecuentes fracturas en los huesos. Una proporción de los casos (15-18%) posee la t(11;14). Otros oncogenes se han involucrado en translocaciones con el cromosoma 14q32, como son *C-MAF* (16q23), *FGFR3/MMSET* (4p16.3), ciclina D3 (6p21), y *MAFB* (20q11). Generalmente tienen ganancias de los cromosomas impares, 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 y 21. Asociado a estas translocaciones, se ha observado sobreexpresión de una de las ciclinas D (D1, D2 y D3). El pronóstico de estos pacientes es malo, con una supervivencia media de 3-4 años (Klein et al., 2010).

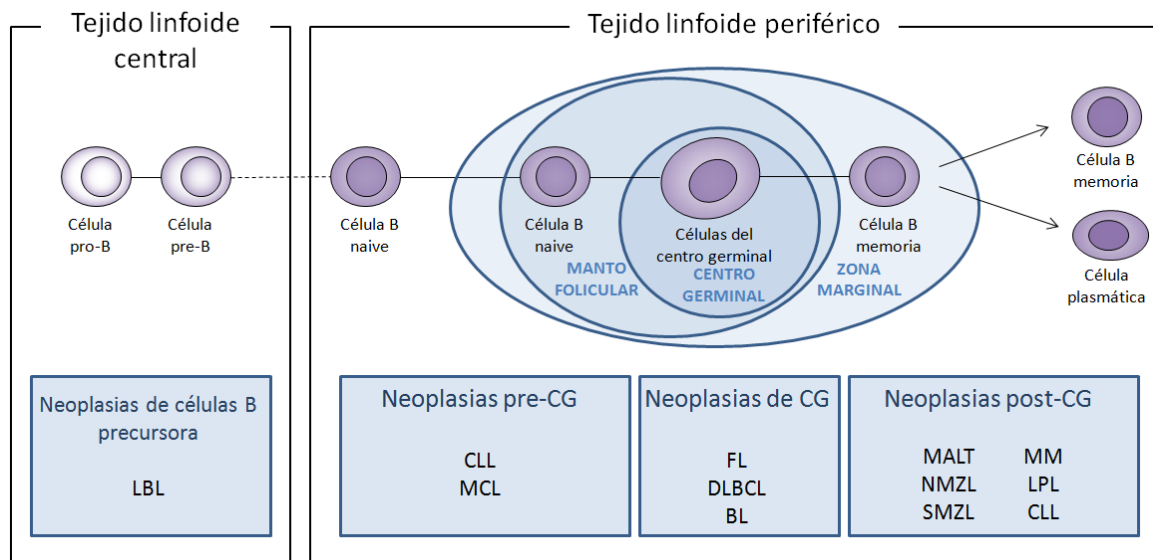


Figura 2. Linfomas de célula B que se han originado en distintas etapas del desarrollo madurativo del linfocito B.

1.4. Epidemiología y factores de riesgo

La incidencia de las neoplasias de célula B madura ha ido aumentando a nivel mundial durante las últimas décadas hasta convertirse en una de las diez enfermedades más comunes, representando el 3-4% de los cánceres diagnosticados en el mundo cada año (Smedby et al., 2011). Además, las frecuencias y la epidemiología entre los distintos linfomas en la población también son muy variados (Figura 3), con diferencias geográficas considerables en la edad de la población afectada y en las formas predominantes de la enfermedad. Generalmente, en EEUU y en los grupos socioeconómicos altos son más frecuentes los linfomas B, las variantes menos agresivas, y afectan principalmente a personas de edad avanzada. Sin embargo, en Asia y África los linfomas de célula T son más frecuentes y concretamente en los países subdesarrollados son comunes los linfomas altamente agresivos, afectando principalmente a gente joven (Ioachim, 2009).

Las causas de la mayoría de las neoplasias de célula B madura permanecen aún desconocidas. Uno de los factores de riesgo conocidos son las inmunodeficiencias y las enfermedades autoinmunes. Aunque no hay evidencias de anormalidad del sistema inmunitario en la mayoría de pacientes con neoplasias de célula B madura, los pacientes con inmunodeficiencias tienen un aumento destacado de incidencia en neoplasias de célula B (particularmente el DLBCL y el BL). Además, la infección de varios virus se ha asociado a muchos linfomas de célula B, tal como el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), el Epstein-Barr Virus (EBV), el herpes virus-8 humano (HHV8) y el HCV. La infección bacteriana por *Helicobacter pylori* también se ha visto implicada en la patogénesis del linfoma MALT. Concretamente, en MCL existen pocos estudios y los que hay no están confirmados, pero se ha observado alguna asociación del MCL con la infección por *Borrelia burgdorferi*, historia familiar de enfermedades hematopoyéticas, la variación genética en la interleuquina-10 y con los genes de factores de necrosis tumoral (*TNF*) (Zhang et al., 2011; Smedby et al., 2011).

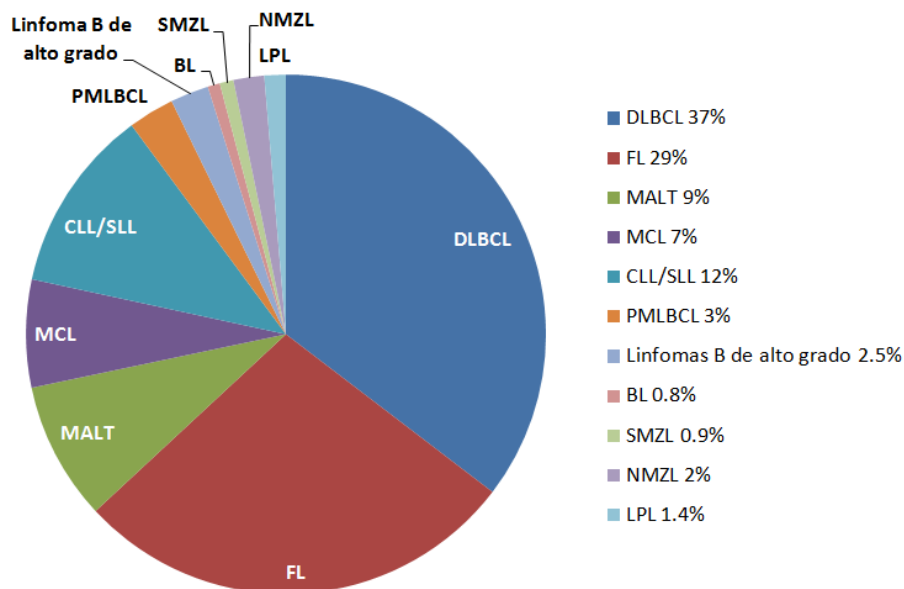


Figura 3. Frecuencias relativas de linfomas de células B. Existen diferencias significativas según las distintas regiones geográficas, aunque DLBCL y FL son las más frecuentes independientemente del grupo geográfico o étnico (Swerdlow et al., 2008).



2. EL LINFOMA DE CÉLULAS DEL MANTO

2.1. Características generales

El linfoma de células del manto (MCL) es una neoplasia muy agresiva y generalmente con mal pronóstico en comparación con otras neoplasias linfoides. Representa el 5-10% de los linfomas de célula B madura. Tiene una llamativa predominancia masculina (relación de afectación hombre/mujer de 2-3/1), y una edad media de diagnóstico cercana a los 70 años (Smedby et al., 2011).

El MCL es una neoplasia de célula B madura caracterizada genéticamente por la translocación $t(11;14)(q13;q32)$. Esta translocación conlleva a la desregulación del gen *CCND1* que codifica para la ciclina D1, localizada en 11q13, debido a la yuxtaposición con el gen de la *IGH* en 14q32 (Figura 4). La detección de la sobreexpresión de la proteína ciclina D1 se emplea en la práctica clínica rutinaria como uno de los elementos más importantes en el diagnóstico de esta enfermedad.

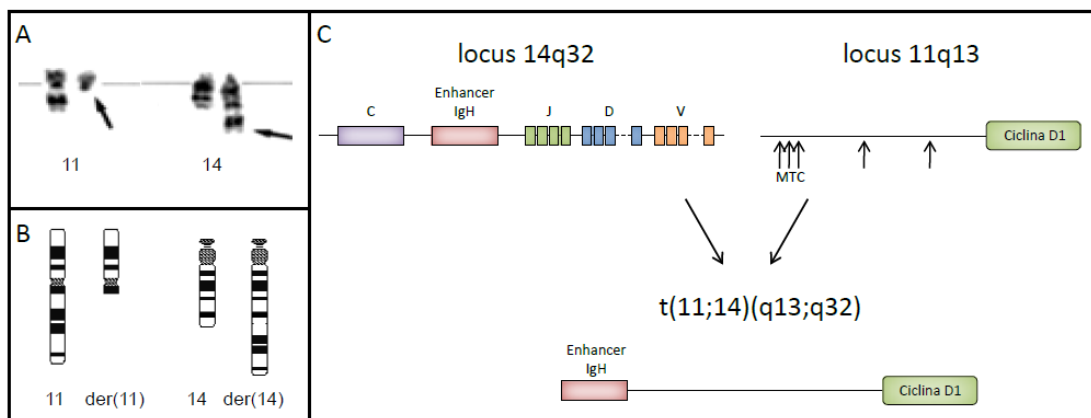


Figura 4. Translocación $t(11;14)(q13;q32)$ de un MCL. (A) Observado mediante citogenética con bandas G (Giemsa); (B) Esquema de la translocación; (C) Estructura del reordenamiento a través del cual el gen de la ciclina D1 queda regulado por el enhancer de la *IGH*. (MTC: Major Translocation Cluster).

Además, el análisis de la región de rotura en los dos cromosomas ha sugerido que esta translocación ocurre en la médula ósea en el estadio temprano pre-B de diferenciación, cuando la célula está iniciando el reordenamiento de los genes de las *IG* con la recombinación de los **segmentos V(D)J** (Welzel et al., 2001). Algunos datos sugieren que la *CCND1* y el locus de *IGH* se encuentran en un espacio físico muy próximo en las células B inmaduras por lo que podría predisponer a la célula a que se produzca dicha translocación (Roix et al., 2003).

El término “linfoma de las células del manto” refleja la idea de que la célula de este tumor es un linfocito en el que su microambiente físico se sitúa en la zona del manto del folículo linfoide secundario (Figura 5). Este hecho se basa en la tendencia que tienen estas células tumorales a crecer y expandirse en esta región y expresar el mismo fenotipo que las células del manto. Sin embargo, la tendencia de estas células es diseminarse por el cuerpo, encontrándose en la mayoría de pacientes linfadenopatías generalizadas, afectación en bazo, en médula ósea y presentación leucémica (Jares et al., 2007; Ferrer et al., 2007).

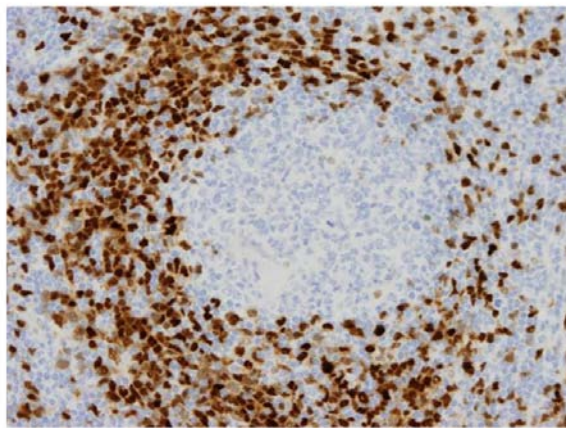


Figura 5. Localización de linfocitos B en la zona del manto del folículo linfoide del MCL. Tinción inmunohistoquímica de la ciclina D1.

Las células del MCL presentan un fenotipo de célula B madura con expresión intensa-moderada de inmunoglobulinas de superficie (IgM/IgD), antígenos asociados a células B como el CD20, CD22, CD79 y el antígeno asociado a células T, CD5. Normalmente no expresan CD23, una molécula de superficie clave para la activación y crecimiento de las células B, tampoco expresan el antígeno asociado a centro germinal CD10, o el factor de transcripción *BCL6* involucrado en la formación y el mantenimiento del centro germinal del folículo linfoide (Jares et al., 2007).

Citológicamente existen dos formas de MCL. La clásica (o típica) (Figura 6) que se define por tener células de tamaño pequeño-intermedio con poco citoplasma y núcleo irregular, y la blastoide que se caracteriza por tener células más grandes, con un curso mucho más agresivo de la enfermedad. La forma blastoide incluye dos variantes, la blástica y la pleomórfica (Figura 6), las dos son variantes agresivas, con un alto índice proliferativo, gran complejidad cariotípica, y una supervivencia promedio de 2 años (Campo et al., 1999a; Beà et al., 1999).

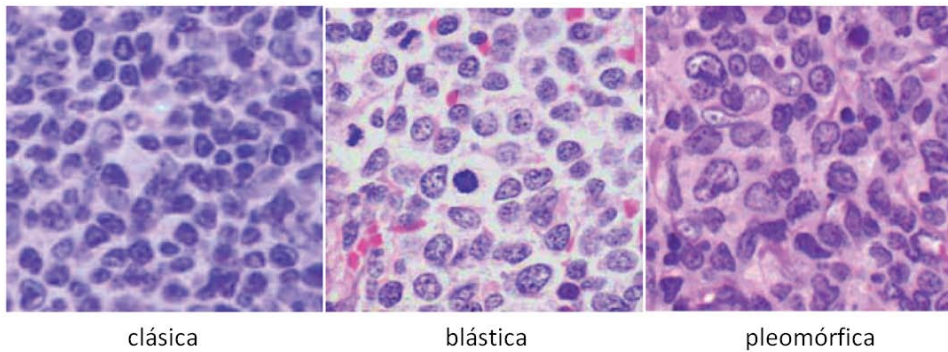


Figura 6. Variantes histológicas principales del MCL.

También se han reconocido otras variantes citológicas de baja frecuencia. La variante de célula pequeña está compuesta por linfocitos redondeados y pequeños, con cromatina condensada, similar a las células de CLL/SLL. En cambio, la variante de zona marginal, tiene células con abundante citoplasma claro imitando al MZL. En el MCL *in situ* se observan las células ciclina D1 positivas exclusivamente restringidas a la zona del manto en los folículos de los ganglios linfáticos reactivos. Este último se suele diagnosticar incidentalmente, y su comportamiento clínico es muy indolente (Swerdlow et al., 2008; Richard et al., 2006; Carvajal-Cuenca et al., 2012).

Además, el MCL puede mostrar uno o una mezcla de tres patrones de crecimiento cuando se presenta en el ganglio linfático: difuso, nodular o de zona del manto. En el patrón difuso las células neoplásicas borran la arquitectura del nódulo linfático. En el patrón nodular, las células neoplásicas están agrupadas en nódulos sin evidencia de centros germinales residuales en la mayoría de los nódulos. Y en el patrón de zona del manto, las células neoplásicas crecen y se expanden preferencialmente rodeando centros germinales (Swerdlow et al., 2008).

2.2. Alteración genética primaria y sus efectos

El tipo de alteraciones de un tumor puede dividirse entre alteraciones primarias y secundarias. Las alteraciones primarias son los primeros cambios que se dan en las células neoplásicas. Se encuentran frecuentemente como alteraciones únicas y a menudo se asocian a determinados tipos de tumores siendo esenciales para establecer el diagnóstico de estos tumores y son generalmente translocaciones cromosómicas. Por otro lado, las alteraciones secundarias

tienen lugar en células que ya son portadoras de una alteración primaria. Generalmente se asocian con la progresión clínica del tumor. Son menos específicas que las alteraciones primarias pero también presentan características que no son debidas al azar, mostrando patrones de distribución dependientes tanto de la alteración primaria presente como del tipo de neoplasia, generalmente son ganancias y pérdidas de material genético (y no translocaciones).

2.2.1. Translocación del gen *CCND1*

Casi todos los casos de MCL tienen la translocación t(11;14)(q13;q32) que conlleva a la yuxtaposición del gen de la *CCND1*, en la posición cromosómica 11q13, con la región 14q32 de la *IGH*, la cual resulta en la sobreexpresión constitutiva de ciclina D1. La translocación t(11;14) se considera el primer evento genético en el MCL.

Los estudios mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH)-multicolor o de citogenética convencional en combinación con análisis de FISH ha mostrado una serie de tumores primarios y líneas celulares con translocaciones t(11;14) complejas involucrando el locus de *IGH* con el de la *CCND1* (Gruszka-Westwood et al., 2002; Salaverria et al., 2008a) y adicionalmente otros cromosomas, como el 3, 6, 8, 10 y 17 (Salaverria et al., 2008a). Además de reordenar con la cadena pesada *IGH*, la *CCND1* también puede hallarse reordenada con las cadenas ligeras. En el MCL solamente se han descrito seis casos con variantes en la translocación de *CCND1* con los genes de la cadena ligera de la *IG*. Tres casos con la fusión de la *CCND1* con la cadena ligera kappa (*IGK*) (Wlodarska et al. 2004), mientras los otros tres casos con la cadena ligera lambda (*IGL*) (Komatsu et al., 1994; Espinet et al., 2010; Rocha et al., 2011)(Tabla 1).

Tabla 1. Translocaciones cromosómicas primarias involucrando el gen de la ciclina D1 observadas en MCL.

Gen CICLINA	Translocación citogenética	Genes fusionados	Frecuencia
	t(11;14)(q13;q32)	<i>IGH-CCND1</i>	99%
<i>CCND1</i>	t(2;11)(p11;q13)	<i>IGK-CCND1</i>	n=3
	t(11;22)(q13;q11)	<i>IGL-CCND1</i>	n=3

Es importante destacar que cinco de los seis casos de MCL publicados con reordenamientos de la cadena ligera de *IG*, no fueron tratados en el diagnóstico, posiblemente debido a su

clasificación errónea como linfoma B leucémico o como una CLL. Solamente dos de estos pacientes se diagnosticaron como MCL. Uno de éstos no se trató y seguía vivo tras cuatro años de seguimiento con una variante de la translocación de la *CCND1* como única anomalía genética (Espinete et al., 2010), mientras el otro MCL mostró un cariotipo complejo y requirió tratamiento en el momento del diagnóstico (Komatsu et al., 1994). Los genes *IGH* estaban mutados en los tres casos analizados con la variante de la translocación de la ciclina D1, sugiriendo que estos casos se pueden haber originado a partir de una célula B que ya ha estado en contacto con antígeno (Wlodarska et al., 2004), un hallazgo normalmente asociado a MCL con un comportamiento clínico indolente.

2.2.2. La ciclina D1 en el ciclo celular

En los MCL, el acúmulo anómalo de ciclina D1 debido a la translocación t(11;14) conduce a la pérdida del punto de control en la transición de las fases G₁ a S del ciclo celular, lo que ocasiona la aceleración de la entrada en la fase S y el mantenimiento de las células en un ciclo de división constante.

El ciclo celular permite a la célula dividirse en dos células hijas genéticamente iguales. Pero la proliferación celular no es sólo la base del desarrollo de un organismo sino también la raíz del primero de los procesos que origina un cáncer: el crecimiento descontrolado de un grupo de células. Es por esta razón por la que el ciclo celular se encuentra sometido a un estricto control necesario para que cada fase se lleve a cabo en el momento preciso y de manera secuencial.

El ciclo de la célula consta de cuatro fases: La fase G₁ es el período que sigue a una división celular, previo a la replicación del DNA, en el que la célula dobla su tamaño debido a la síntesis continua de todos sus componentes. Hay células que pueden parar su progresión hacia la división en este estadio y permanecer durante años en estado de reposo, o fase G₀. En la fase G₁ existe el punto de control llamado “de restricción R”, en el que la célula comprueba que ha generado la masa necesaria para poder comenzar con la síntesis de DNA y que las condiciones ambientales son favorables. La fase S es en la que se replica el DNA. La fase G₂ es el periodo comprendido entre la finalización de la replicación del DNA y el inicio de la división. En esta fase, hay un segundo punto de control G₂-M, en el que la célula comprueba que ha completado la duplicación del DNA y que ha duplicado su masa. Finalmente, las células entran en la fase M (mitosis) en la que los cromosomas se condensan y se preparan para que las cromátidas hermanas se separen equitativamente. En este momento, existe el punto de control M, que sólo permite avanzar si todos los cromosomas están alineados. La existencia de

los puntos de control es clave porque sirven de freno, asegurando el correcto proceso de división y permitiendo el control del ciclo mediante señales externas (Figura 8).

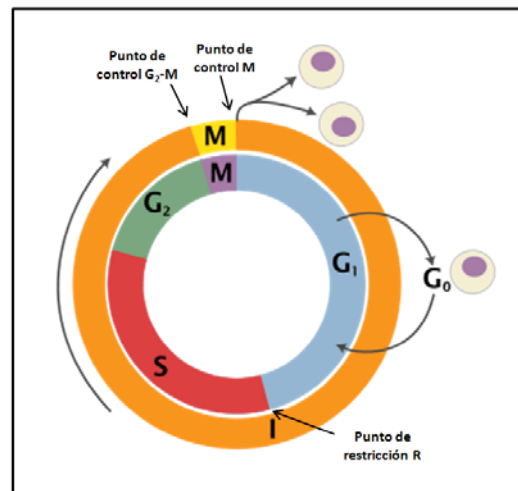


Figura 8. Ciclo celular con fases y puntos de control. M: mitosis, I: interfase.

La regulación del ciclo celular se produce mediante ciclinas y quinasas dependientes de ciclina (CDKs). Las quinasas son enzimas capaces de fosforilar otras proteínas mediante la transferencia de grupos fosfato. El resultado de la fosforilación de una proteína es generalmente un cambio en su actividad, por lo que tiene un papel esencial como método para activar o inactivar la funcionalidad de proteínas. Así, las CDKs coordinan los procesos de control del ciclo celular fosforilando proteínas, regulado por la asociación reversible de las ciclinas.

Existen dos clases principales de ciclinas, las ciclinas G₁, que regulan el punto de restricción R y las ciclinas mitóticas, que regulan el punto G₂-M. Las ciclinas de la etapa G₁ son de los tipos D (D1, D2, D3) y E, y tienen una vida media corta en la que sus niveles se regulan por transcripción. Las ciclinas mitóticas son de tipo A y B y son estables durante la interfase pero son degradadas rápidamente durante la mitosis.

Las ciclinas D1, D2 y D3 tienen una vida media muy corta y su síntesis está inducida en las células por factores de crecimiento, y está inhibida por factores que reducen la proliferación celular, como el factor TGF- β . Las ciclinas D se unen a varias CDKs (CDK2, CDK4, CDK5 y CDK6), pero principalmente a CDK4. Una de las funciones básicas del complejo ciclina D-CDK4 es fosforilar la proteína Rb (retinoblastoma) y activar así la expresión de genes necesarios para la entrada en la fase S (Figura 9). Rb se fosforila específicamente en la transición G₁-S y

permanece así hasta el final de la fase M. La proteína Rb, cuando está hipofosforilada se une e inhibe a varios factores activadores de la transcripción, como E2F, que controlan la expresión de genes críticos para la síntesis de DNA. Así, queda bloqueada la progresión del ciclo celular. Sin embargo, tras su fosforilación al final de la fase G₁, Rb ya no es capaz de unir y bloquear a estos factores activadores, promoviendo la entrada en fase S (Figura 9).

Cuando la ciclina D se expresa permanentemente, sin la necesidad de la presencia de factores de crecimiento, se acelera la entrada en fase S y las células se mantienen dividiéndose constantemente, por ello se considera un oncogén.

La ciclina E forma complejos con CDK2 implicados en el inicio de la fase S, y fosforila la proteína Rb (Figura 9). La sobreexpresión de la ciclina E causa también un moderado aumento de la entrada en fase S.

A pesar de inducir la progresión del ciclo celular, se ha observado que la sobreexpresión de ciclinas D por sí mismas no son suficientes para inducir la transformación ya que necesitan la cooperación de otros oncogenes. Se ha demostrado con ratones transgénicos, en los que la *CCND1* unida a elementos regulatorios de *IGH* no desarrollaban linfomas espontáneamente sino que requieren de la cooperación de otros oncogenes como *MYC* (Bodrug et al., 1994; Lovec et al., 1994).

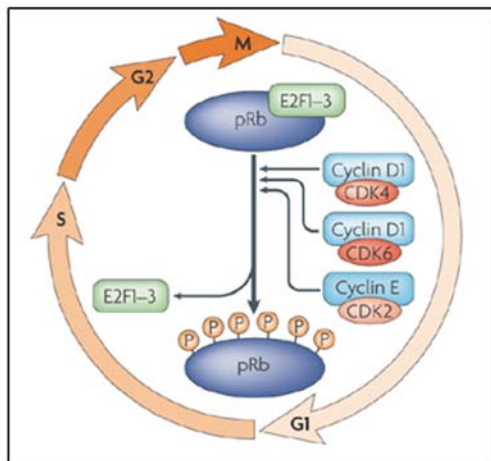


Figura 9. La ciclina D1 en la progresión del ciclo celular. La entrada en la fase S se caracteriza por la fosforilación de Rb mediante los complejos CDK4-ciclina D1, CDK6-ciclina D1 y CDK2-ciclina E. Así se liberan los factores de transcripción E2F que activan los genes requeridos para la progresión del ciclo celular (Coller et al., 2007).

2.2.3. Algunos MCL no sobreexpresan ciclina D1

La translocación t(11;14) es el evento principal que se encuentra en casi todos los MCL, pero hace unos años, se reconoció un pequeño grupo de linfomas parecidos morfológica y fenotípicamente a los MCL convencionales, pero con ausencia de la translocación y sin

expresión de la ciclina D1. Esta controversia fue aclarada con un estudio de perfiles de expresión génica en que casos ciclina D1 negativos mostraban una firma de expresión global similar a los MCL convencionales positivos para ciclina D1 (Fu et al., 2005). A partir de entonces, quedó confirmado que ambos (MCL ciclina D1 positivo y negativo) pertenecían a la misma entidad. Más adelante, la identificación de un perfil de alteraciones secundarias similares entre los dos grupos reforzó este hallazgo (Salaverria et al., 2007; Hartmann et al., 2011). Curiosamente, en ausencia de ciclina D1, estos MCL sobreexpresaban ciclina D2 o D3, pero en los seis casos estudiados no se encontraron alteraciones cromosómicas evidentes afectando a estos loci.

Estudios posteriores detectaron algunos casos aislados de MCL sin sobreexpresión de ciclina D1 pero con altos niveles de ciclina D2 debido a las translocaciones cromosómicas involucrando a la *CCND2* con los genes de las *IG*, fusionando la *CCND2* al locus *IGK* (Gesk S et al., 2006), *IGL* (Shiller et al., 2011) o *IGH* (Herens et al., 2008). Solo se ha descrito un caso con translocación de *CCND3* con *IGH* (Tabla 2) (Wlordaska et al., 2008). También se ha observado la rotura del gen *CCND2* sin conocer su pareja de translocación (Quintanilla-Martinez et al., 2009). Sin embargo, estos estudios corresponden a casos aislados y la incidencia real de estas translocaciones aún no se ha estudiado en esta variante de MCL.

Tabla 2. Translocaciones cromosómicas primarias en MCL ciclina D1 negativo.

Gen CICLINA	Translocación citogenética	Genes fusionados	N. casos
CCND2	t(12;14)(p13;q32)	<i>IGH-CCND2</i>	n=1
	t(2;12)(p11;p13)	<i>IGK-CCND2</i>	n=2
	t(12;22)(p13;q21)	<i>IGL-CCND2</i>	n=1
	t(12;?)(p13;?)	?- <i>CCND2</i>	n=1
CCND3	t(6;14)(p21;q32)	<i>IGH-CCND3</i>	n=1

Son pocos los casos conocidos de MCL negativos para la ciclina D1 y al no poseer la translocación principal ni la sobreexpresión de ciclina D1, claves para el correcto diagnóstico de los MCL, se hace difícil el reconocimiento de esta variante y en muchas ocasiones se clasifica erróneamente, por lo que sería de mucha utilidad encontrar marcadores fiables para su reconocimiento. Además, el número de casos de linfoma de células del manto ciclina D1 negativos reconocidos es muy escaso. Por tanto, un estudio más completo con una serie de casos más extensa sería de gran ayuda para caracterizar mejor esta variante tumoral y entender los mecanismos patogénicos que dan lugar a esta enfermedad.

2.3. Alteraciones genómicas secundarias

La aplicación de la hibridación genómica comparada (CGH) ha permitido definir los patrones característicos de ganancias y pérdidas en los genomas de los tumores. En este sentido, los estudios de CGH publicados han mostrado que los MCL tienen un perfil característico de alteraciones genómicas no aleatorias que parecen necesarias para la progresión de la enfermedad. Cabe destacar que la alta incidencia de pérdidas de 11q y 13q solamente se ha encontrado en MCL y en CLL (Beà et al., 1999; Bentz et al., 2000), pero prácticamente no se ha visto en otros linfomas de célula B, sugiriendo que estas dos entidades pueden compartir mecanismos patogénéticos comunes. En comparación con otros linfomas de célula B, el MCL presenta el número más alto de casos con alteraciones genéticas (93%) y además, es uno de los que tiene más alteraciones por caso, poniendo de manifiesto la gran inestabilidad genómica de los MCL (Beà et al., 2008). Las regiones más frecuentemente delecionadas son 1p (32%), 6q (25%), 8p (26%), 9p (20%), 9q (15%), 10p (13%), 11q (27%), 13q (41%), y 17p (19%); mientras que las regiones ganadas más comunes son 3q (46%), 7p (15%), 8q (21%), 12q (15%), 15q (15%) y 18q (12%) (Figura 10) (Beà et al., 1999; Salaverria et al., 2007; Bentz et al., 2000; Monni et al., 1998; Martinez-Climent et al., 2001; Allen et al., 2002; Jarosová et al., 2004; Ferrer et al., 2007). Otra observación constante en los cariotipos del MCL, especialmente en las variantes blastoides, es la presencia de cariotipos tetraploides (Espinete et al., 2010; Wlodarska et al., 1999).

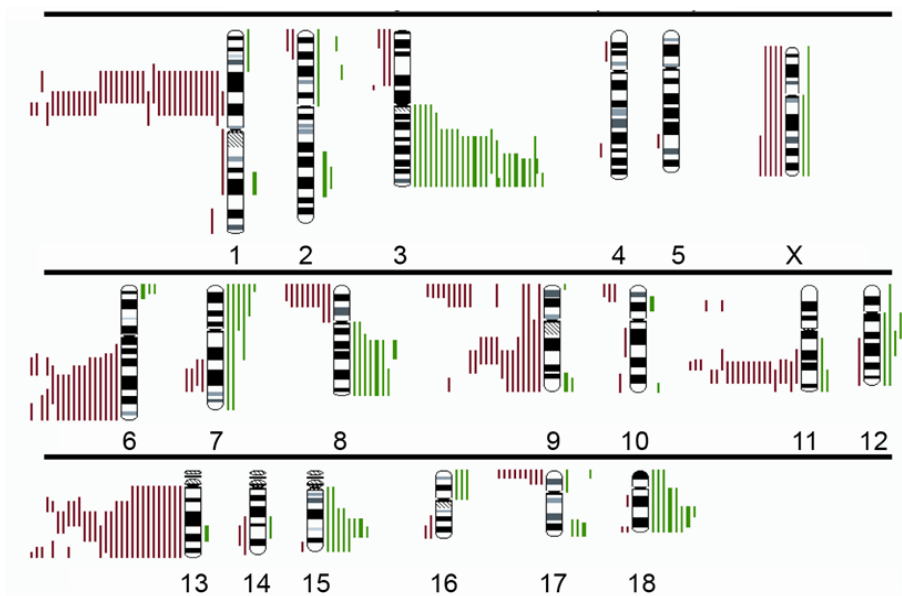


Figura 10. Ideograma de la distribución de ganancias (verde) y pérdidas (rojo) de DNA detectado mediante hibridación genómica comparada (CGH) en 71 casos de MCL (Salaverria et al., 2007).

Los casos blastoides de MCL presentan un mayor número de alteraciones (Beà et al., 1999; Salaverria et al., 2007) y el estudio de muestras secuenciales en el tiempo de algunos casos ha demostrado que se adquieren alteraciones durante la progresión de la enfermedad (Monni et al., 1998). Por ejemplo, dos MCL clásicos que contenían solamente una ganancia de 3q en el diagnóstico adquirieron pérdidas de 9p y 17p, amplificación de 8q24 y morfología blastoide en la recaída. En dos pacientes adicionales, la muestra en la recaída adquirió la pérdida del cromosoma 9, 1p, Xp y ganancia de 8q (Monni et al., 1998).

2.4. Genes diana candidatos en el desarrollo del MCL

La información derivada de los estudios de genomas con *arrays* ha sido muy útil para acotar las regiones recurrentemente alteradas en MCL proponiendo genes diana candidatos frecuentemente delecionados o amplificados que pueden jugar un papel importante en el desarrollo del tumor.

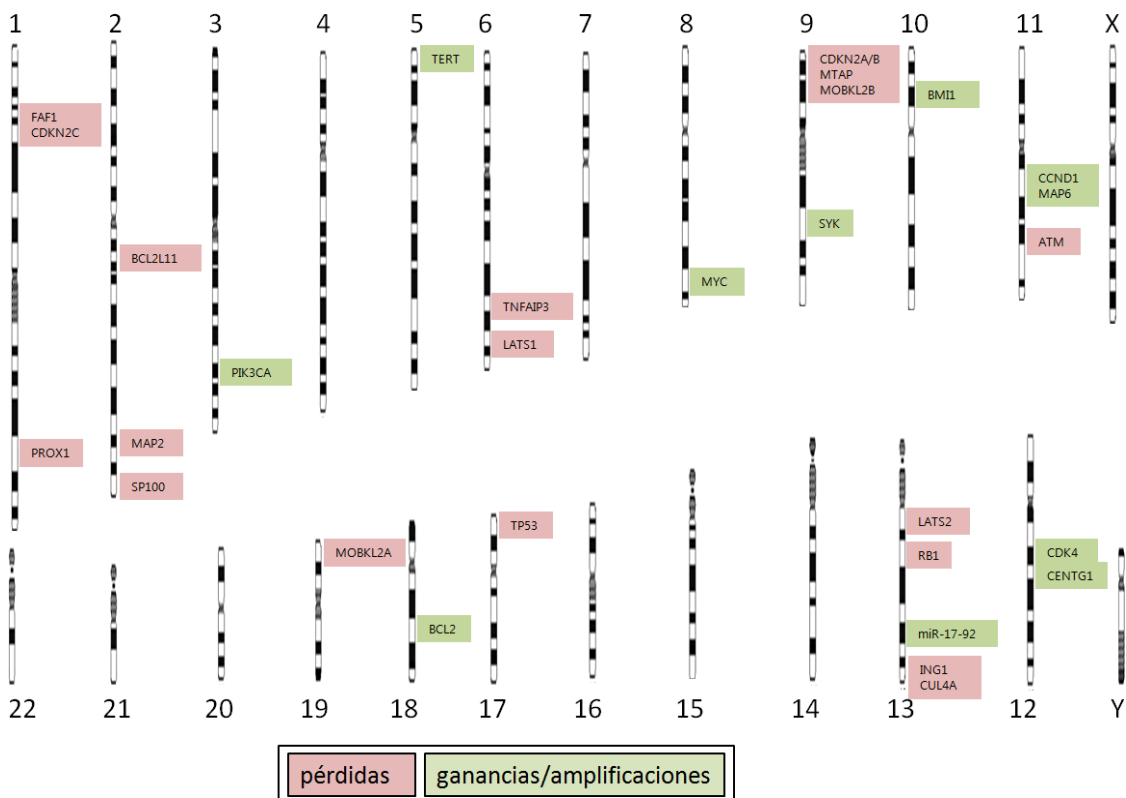


Figura 11. Posibles genes diana que se encuentran frecuentemente alterados en MCL, y cuya expresión está desregulada a causa de la alteración genética.

Posibles genes candidatos delecionados en MCL:

FAF1: localizado en 1p32.3. Media la muerte celular por apoptosis a través de la interacción del ligando-antígeno de FAF1 (Park et al., 2007). Se ha encontrado afectado por deleción bialélica en algunos MCL (Beà et al., 2009) y en la línea celular UPN1. Se ha visto una gran disminución de su expresión en los casos con esta deleción y se ha asociado a mal pronóstico (Hartmann et al., 2010).

CDKN2C (p18): localizado en 1p32.3, muy próximo a FAF1. La proteína codificada por este gen es un miembro de los inhibidores de quinasas dependientes de ciclina (CDK) de la familia INK4. Esta proteína interacciona con CDK4 o CDK6 y previene la activación de las quinasas CDK, por lo que funciona como regulador de la progresión de G₁ en el ciclo celular. La deleción bialélica de este gen se ha encontrado en casos primarios de MCL (Hartmann et al., 2010) y en la línea celular de MCL UPN-1 (Beà et al., 2009; Vater et al., 2009).

PROX1: localizado en 1q32.3. Los miembros de esta familia contienen un dominio *homeobox* que tiene una estructura hélice-vuelta-hélice de unión a DNA y a RNA. La proteína codificada por este gen está muy conservada en vertebrados y puede jugar un papel esencial en el desarrollo. Se ha encontrado una buena correlación entre la disminución de la expresión de *PROX1* con su deleción, por lo que ha sido sugerido su papel como gen supresor de tumor en algunos tumores sólidos como el carcinoma del sistema biliar (Laerm et al., 2007) y se ha encontrado mutado en líneas celulares derivadas de neoplasias hematológicas (Nagai et al., 2003). La pérdida monoalélica de *PROX1* se ha asociado a una disminución de la expresión de este gen y a un mal pronóstico en MCL (Hartmann et al., 2010).

BCL2L1 (BIM): localizado en 2q13. La proteína codificada por este gen pertenece a la familia de proteínas de BCL2. Dicha proteína contiene BH3 (dominio 3 de homología a Vcl-2) e interacciona con miembros de la familia de proteínas BCL2 y actúa como activador de la apoptosis. La deleción homocigota de este gen se ha encontrado en casos primarios (Hartmann et al., 2010) y en la línea celular de MCL JEKO1 (Beà et al., 2009; Vater et al., 2009).

MAP2: localizado en 2q34. Este gen codifica para una proteína que pertenece a la familia de proteínas asociadas a microtúbulos. Las proteínas de esta familia están involucrados en la dinámica de los microtúbulos de la neurogénesis y se ha implicado recientemente en la migración de células cancerosas epiteliales (Liu et al., 2008). La línea celular de MCL UPN-1 tiene deleción homocigota de este gen (Vater et al., 2008; Beà et al., 2009).

SP100: localizado en 2q37.1. Codifica para un miembro constitutivo de los cuerpos nucleares, junto con las proteínas PML, TP53, y DAXX (Bernardi et al., 2007). Esta proteína se une a proteínas de la heterocromatina y se cree que juega un papel importante en tumorigénesis, inmunidad y regulación génica. Se ha encontrado deleción bialélica en las líneas celulares de MCL MINO Y JEKO1 (Beà et al., 2009) y deleción monoalélica en un 33% de casos primarios de MCL (Beà et al., 2009).

TNFAIP3 (A20): localizado en 6q23.3. Se identificó inicialmente como un gen cuya expresión era inducida por el factor de necrosis tumoral (TNF). La proteína codificada por este gen inhibe

la activación de la vía de NF κ B y la apoptosis mediada por TNF. Dicha proteína, que tiene actividad ubiquitín-ligasa y deubiquitinasa, está involucrada en la respuesta inflamatoria y en la respuesta inmunitaria mediada por citoquinas. La delección de este gen se ha asociado con mutaciones inactivantes o hipermetilación de su promotor (Honma et al., 2009).

CDKN2A/ARF (p16): Localizado en 9p21.3 y se encuentra delecionado en el 7-30% de los MCL (Jarosová et al., 2004; Monni et al., 1998; Pinyol et al., 1997). Este gen genera distintas variantes que difieren en los primeros exones. Al menos existen tres variantes de *splicing* que codifican distintas proteínas, dos de las cuales son inhibidores de la quinasa CDK4. Por otro lado, uno de los transcritos contiene un primer exón alternativo, con un *open reading frame* alternativo (ARF) que produce una proteína muy distinta estructuralmente a las otras variantes. Este producto de ARF funciona como un estabilizador de p53, ya que puede interaccionar y secuestrar a MDM2, una proteína responsable de la degradación de p53. Tanto las isoformas inhibitoras de CDK como el producto ARF codificado por este gen, comparten una funcionalidad común en el control de G₁ del ciclo celular. Este gen está frecuentemente inactivado en muchos tumores al ser un gen supresor de tumores muy importante. La pérdida de expresión de *CDKN2A* es la consecuencia más importante de la pérdida genómica de 9p21.3 en MCL (Beà et al., 2009; Nieländer et al., 2007; Hartmann et al., 2010; Pinyol et al., 1997).

CDKN2B (p15): Localizado en 9p21.3. Este gen se encuentra adyacente a *CDKN2A* en la región que está frecuentemente mutada, delecionada y hipermetilada en muchos tipos distintos de tumores. Este gen codifica para un inhibidor de CDK, que forma complejos con CDK4 o CDK6, y previene la activación de las quinasas CDK, por lo tanto, la proteína codificada funciona como un regulador de crecimiento celular que controla la progresión de G₁ del ciclo celular. Tanto *CDKN2A* como *CDKN2B* se han encontrado en delección bialélica tanto en tumores primarios como en las líneas celulares de MCL GRANTA-519, REC-1 y MAVER-1 (Beà et al., 2009; Hartmann et al., 2010; Vater et al., 2009).

MTAP: Se localiza en 9p21.3. Este gen codifica una enzima que juega un papel importante en el metabolismo de las poliaminas. La pérdida de esta enzima hace a la célula dependiente de la síntesis *de novo* de adenosina. Este gen junto con p16 esta codelecionado en muchos tumores. La ausencia de expresión de *MTAP* está asociada a mal pronóstico en MCL (Marcé et al., 2006; Hartmann et al., 2010).

MOBK2B: localizado en 9p21.2, **MOBK2A** en 19p13.3, **LATS1** en 6q25.1 y **LATS2** en 13q12.11. Estos genes forman parte de la vía del *hipo pathway*. Esta vía parece ser importante en el desarrollo de cáncer mediante la regulación de la proliferación y de los puntos de control de la mitosis (Zeng et al., 2008; Hartmann et al., 2010). Los casos con pérdidas de alguno de estos genes presentan una mayor proliferación, complejidad genética y supervivencia más corta en comparación con los casos sin alteraciones en ninguno de estos genes (Hartmann et al., 2010). Las alteraciones en estos cuatro genes se presentan de manera mutuamente excluyente y en general afectan a un 38% de los MCL (Hartmann et al., 2010).

ATM: está localizado en 11q22.3. Codifica para una fosfoproteína que pertenece a la superfamilia fosfatidilinositol 3/4-quinasa (PI3/4K). Regula muchas proteínas, incluyendo supresoras de tumores como p53 y BRCA1, quinasas de control como CHK2, proteínas de control como RAD17 y RAD9, y proteínas de reparación como NBS1. Las proteínas ATM junto

con ATR están consideradas las principales controladoras de las vías de control del ciclo celular y respuesta al daño al DNA. Las mutaciones en este gen están relacionadas con la enfermedad genética autosómica recesiva Ataxia Telangiectasia y otros tipos de cáncer. En MCL se encuentra mutado y coincide frecuentemente con la delección del alelo restante (Camacho et al., 2002; Greiner et al., 2006). Este gen se encuentra delecionado en el 19-37% de los MCL (Bentz et al., 2000; Jarosová et al., 2004) y se asocia a casos con elevada inestabilidad genómica (Camacho et al., 2002).

RB1: se localiza en 13q14.2. El gen del retinoblastoma codifica para una proteína que interviene en la fase G₁ tardía, previniendo la entrada inadecuada a la fase S. RB1 regula factores de transcripción de la familia E2F modulando sus niveles. El secuestro de E2F por parte de RB1 implica la no-activación de la transcripción en estos genes necesarios para la progresión del ciclo celular. Se han asociado delecciones alélicas con mutaciones de este gen en el otro alelo en casos primarios de MCL (Pinyol et al., 2007). La línea celular UPN-1 contiene este gen delecionado (Beà et al., 2009; Pinyol et al., 2007; Vater et al., 2008).

ING1: localizado en 13q34. Codifica para una proteína supresora de tumores que pertenece a la vía de señalización de p53 y está involucrada en la restricción del crecimiento celular y proliferación, apoptosis, mantenimiento de la estabilidad genómica, y modulación de los puntos de control del ciclo celular. La pérdida monoalélica de *ING1* se ha asociado a una disminución de la expresión de este gen en MCL (Hartmann et al., 2010).

CUL4A: localizado en 13q34. Es una ubiquitin-ligasa de E3 que se ha visto involucrada en la respuesta al daño al DNA. CUL4 se une al locus de *CDKN2A* y se ha sugerido que los complejos DDB1-CUL4 y MLL1 constituyen una vía nueva que media la activación de *CDKN2A* durante el punto de control de respuesta oncogénica (Kotake et al., 2009). La pérdida monoalélica *CUL4A* se ha asociado a una disminución de la expresión de este gen en MCL (Hartmann et al., 2010).

TP53: se localiza en 17p13. Codifica para una fosfoproteína nuclear que juega un papel importante en el desarrollo tumoral. Entre otras funciones, participa en el punto de restricción de G₁ que permite a la célula reparar los daños que se hayan podido producir en el DNA durante la replicación antes de que entre en fase de división, bloqueando el ciclo celular y activando la apoptosis, para evitar la acumulación de mutaciones potencialmente oncogénicas y la inestabilidad genómica. La inactivación de *TP53* tiene un efecto importante en la aparición de cáncer. Se encuentra delecionado en un 50% de los tumores humanos y en el 4-30% de los MCL (Bentz et al., 2000; Jarosová et al., 2004; Jares et al., 2007). Las delecciones de TP53 están asociadas con la variante blastoide, la alta complejidad genética y un peor pronóstico en pacientes de MCL (Beà et al., 1999; Hernández et al., 1996).

Posibles genes candidatos amplificadas en MCL:

PIK3CA: Localizado en 3q26.3. El gen *PIK3CA* codifica para una subunidad catalítica de PI3K y su amplificación correlaciona con la sobreexpresión y activación de la vía de AKT (Psyrris et al., 2009). El brazo largo del cromosoma 3 es una región frecuentemente ganada y a veces

amplificada en MCL en distintas regiones, pero los genes diana potenciales aún no se han identificado.

TERT: Localizado en 5p15.33, codifica para la telomerasa. Esta enzima mantiene los extremos de los telómeros añadiendo la repetición TTAGGG. La expresión de la telomerasa juega un papel importante en senescencia celular dado que su expresión está reprimida en células somáticas postnatales resultando en el acortamiento progresivo de los telómeros. Unos pocos MCL tienen amplificación o roturas en 5p15 involucrando la región *TERT/CLPTM1L*. Ninguno de ellos se ha encontrado en yuxtaposición con ninguno de los tres loci de *IG*, pero sí se ha demostrado expresión de mRNA de TERT y actividad telomerasa (Nagel et al., 2010).

MYC: se localiza en 8q24.21. Es el homólogo celular del retrovirus aviar en vertebrados (*v-MYC*). Su expresión produce inmortalización celular, puede inducir apoptosis y funciona como factor de transcripción que regula la transcripción de dianas específicas. En estado normal se expresa en células que proliferan, acelerando el ciclo celular. Las mutaciones, la sobreexpresión, y los reordenamientos de este gen están asociados a una gran variedad de tumores como en el BL. El 11-32% de los MCL tienen ganancias de *MYC* (Salaverria et al., 2007; Martinez-Climent et al., 2001) y también se ha encontrado amplificado recurrentemente (Rubio-Moscardo et al., 2005; Beà et al., 2009). Su sobreexpresión se asocia con mal pronóstico en MCL (Hernández et al., 1999).

SYK: Localizado en 9q22.2. Es una tirosin-quinasa involucrada en la vía de señalización del receptor de células B (BCR). Se ha encontrado amplificado a nivel de DNA, y sobreexpresado a nivel de mRNA y proteína. La inhibición de SYK se ha propuesto como una estrategia terapéutica en linfomas, ya que el tratamiento con dicho inhibidor (picetannol) en la línea celular de MCL JEKO-1 que sobreexpresa *SYK* induce parada en la proliferación celular y apoptosis (Rinaldi et al., 2005).

BMI1: localizado en 10p12.2 y se encuentra alterado entre el 1-13% de todos los MCL (Salaverria et al., 2007; Allen et al., 2002). Pertenece al grupo Polycomb (complejo represor transcripcional) que interviene en el ciclo celular como represor de la transcripción del locus *CDKN2A INK4a*. La amplificación de *BMI1* puede suponer un mecanismo alternativo a las deleciones de *CDKN2A*, y se ha observado alterado en MCL agresivos (Beà et al., 2001). Amplificaciones recurrentes de este gen se han encontrado en MCL (Rubio-Moscardo et al., 2005; Kohlhammer et al., 2004; Beà et al., 1999; Beà et al., 2001).

CCND1: Localizado en 11q13.3. La proteína codificada por este gen es un regulador de las quinasas CDK y su actividad es necesaria para la transición G₁/S del ciclo celular. Se ha visto que esta proteína interacciona con Rb y funciona como regulador positivo la expresión de ciclina. La amplificación de *CCND1* puede ser un mecanismo adicional para incrementar los niveles de ciclina D1, tal como ocurre con los transcritos truncados de 1.5Kb de ciclina D1 en que se asocian con niveles muy altos de expresión de mRNA (Wiestner et al., 2007). La amplificación de *CCND1* se ha observado tanto en líneas celulares HBL2 y MAVER1 como en casos primarios de MCL (Beà et al., 2009; Gruszka-Westwood et al., 2002).

MAP6: Localizado en 11q13.5. Es una proteína de asociación a microtúbulos que actúa en su dinámica. Las propiedades dinámicas de los microtúbulos son esenciales para unirse al huso

mitótico y permitir el movimiento de los cromosomas en la división celular. La familia de las MAPs (*microtubule-associated proteins*) incluye oncogenes, genes supresores tumorales y reguladores de la apoptosis, sugiriendo que la alteración de la dinámica de los microtúbulos y cambios sus propiedades podrían ser eventos críticos en la tumorigénesis y en la progresión tumoral (Bhat et al., 2007). Se ha descrito la amplificación de este gen en tres líneas celulares de MCL (MAVER-1, JEKO-1 y HBL-2) y en 1/26 casos primarios de MCL (Vater et al., 2009).

CDK4: Localizado en 12q14. La proteína codificada por *CDK4* es un miembro de la familia de serín-treonín-quinasas. Es una subunidad catalítica del complejo proteín-quinasa importante para la progresión de la fase G₁ del ciclo celular. En MCL se encuentra ganado en el 5-30% de los casos (Martinez-Climent et al., 2001; Allen et al., 2002). Amplificaciones recurrentes de esta región se han encontrado en MCL (Hernández et al., 2005; Beà et al., 1999).

CENTG1: Localizado en 12q14. *CENTG1* codifica para una proteína que media efectos antiapoptóticos del factor de crecimiento neural a través de la activación de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) nuclear. Se encuentra sobreexpresado en distintos cánceres y promueve la invasión celular. Se encuentra altamente sobreexpresado a nivel de mRNA en los MCL con esta alteración genética (Hartmann et al., 2010).

MIR17HG: Localizado en 13q31.3, y codifica para el cluster miR-17-92, un grupo de seis microRNAs que están involucrados en supervivencia celular, proliferación, diferenciación y angiogénesis. Se ha encontrado frecuentemente amplificado y sobreexpresado en MCL. Está implicado en la progresión tumoral por inhibición de la muerte celular a través de la cooperación con *MYC* (Navarro et al., 2009; Beà et al., 2009).

BCL2: está localizado en 18q21.33 y codifica para una proteína de membrana mitocondrial que bloquea la muerte por apoptosis de algunas células como los linfocitos. Es una región frecuentemente ganada y amplificada en MCL (Beà et al., 1999; Kohlhammer et al., 2004; Beà et al., 2009). El 7-26% de los MCL presenta ganancias en este gen (Monni et al., 1998; Bentz et al., 2000) y se ha encontrado sobreexpresado en las variantes blastoides (Zhu et al., 2002). Cuatro líneas celulares de MCL (MINO, HBL2, Z138, GRANTA519, MAVER1) tienen ganancias de éste gen (Beà et al., 2009).

La información de los *arrays* ha sido también de gran utilidad para entender los distintos patrones de inestabilidad cromosómica y generación de reordenamientos secundarios en estos tumores. En este sentido, el uso de *arrays* de DNA de alta densidad como los **SNP-array** de Affymetrix, ha aportado algunas claves en relación a alteraciones generadas a partir de múltiples **ciclos de rotura-fusión-puente** (breakage-fusion-bridge, BFB) o múltiples reordenamientos generados a partir de un único evento catastrófico llamado **cromotripsis**, un fenómeno recientemente descrito usando tecnologías de secuenciación de nueva generación en un 2-3% de todos los tumores existentes (Stephens et al., 2009).

Los estudios de *SNP-arrays* también han permitido la identificación de la disomía uniparental (UPD) o *copy number neutral-loss of heterozigosity* (CNN-LOH), implicando la pérdida de una de las contribuciones paternas del genoma. Este suceso puede ocurrir en personas sanas en forma de UPD de un cromosoma o parte de él, originado por un fallo en la disyunción mitótica en la que los cromosomas se segregan de manera errónea durante la mitosis o por un fenómeno de recombinación mitótica. En cáncer, este suceso puede ser adquirido y recibe el nombre de CNN-LOH en el que se ven dos copias mutadas de genes supresores de tumores u oncogenes. Estas alteraciones pueden representar un mecanismo alternativo a deleciones cromosómicas para la inactivación de genes supresores de tumores (Figura 12) (Bruce et al., 2005), o a la duplicación de mutaciones activantes (p.e. *JAK2*) (Thoennissen et al., 2010).

En este sentido, CNN-LOH en MCL ocurre en regiones cromosómicas afectadas por pérdidas genómicas y concretamente 17p13.1 es una de las más comunes y frecuentemente asociada a mutaciones de *TP53* (Vater et al., 2009; Beà et al., 2009; Hartmann et al., 2010).

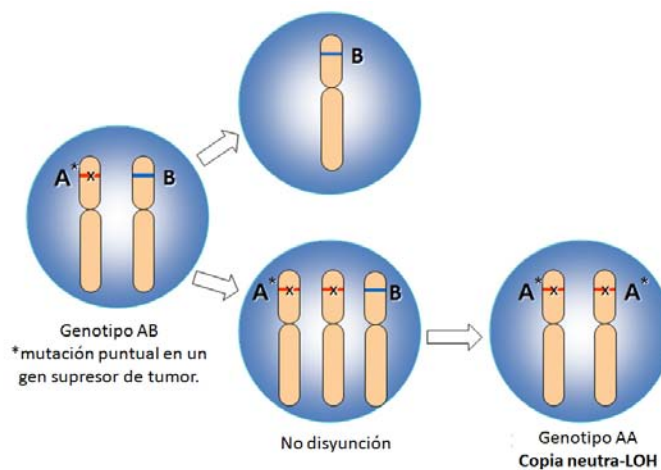


Figura 12. Proceso de formación de las UPD adquiridas.

Las variaciones en número de copia (CNV) y las duplicaciones segmentarias (SD) son variaciones estructurales reconocidas recientemente en el genoma. Estas variaciones estructurales pueden facilitar la inestabilidad de la región y contribuir a la variabilidad genómica y susceptibilidad potencial a enfermedades (Stankiewicz et al., 2010). Curiosamente, los puntos de rotura que flanquean la mayoría de alteraciones cromosómicas, incluyendo deleciones, amplificaciones y CNN-LOH en MCL están significativamente enriquecidos en SD y CNV (15% y 46%, respectivamente) (Beà et al., 2009).

2.5. Genes y vías metabólicas afectadas por las alteraciones genómicas

El análisis de genes incluidos en las múltiples regiones cromosómicas afectadas en MCL es indicativo de que estas alteraciones están afectando a genes que participan en determinadas vías metabólicas, y sugieren que su alteración puede ser importante en la patogénesis de estos tumores. Estas vías incluyen la regulación del ciclo celular, el daño y la reparación del DNA, la supervivencia celular, la vía de señalización *Hippo*, y las proteínas asociadas a microtúbulos.

2.5.1. El ciclo celular y respuesta al daño del DNA

La translocación t(11;14)(q13;q32) resulta en la sobreexpresión constitutiva de la ciclina D1 hecho crucial en la desregulación del ciclo celular. La ciclina D1 se une a CDK4 y controla la transición de la fase G₁-S. La alteración de ciclina D1 y la amplificación/sobreexpresión de CDK4 promueven la hiperfosforilación de RB1 y su consecuente inactivación conduciendo al avance acelerado del ciclo celular. Además, otra manera de incrementar la inactivación de RB1 es el secuestro de p27 por los altos niveles de los complejos ciclina D1-CDK4, ya que la separan de los complejos ciclina E-CDK2. También la unión de p27 a los complejos CDK4-ciclina D1 facilita su degradación. De este modo, se activa el complejo ciclina E-CDK2, finaliza la fosforilación de RB1 y conduce al avance del ciclo celular.

Otros mecanismos de activar esta fase del ciclo celular son las mutaciones inactivantes de *RB1* en variantes agresivas de MCL (Pinyol et al., 2007) y la delección homocigota del locus *CDKN2A* (en 9p21) que codifica para *INK4a* (inhibidor de CDK) que aseguraría la actividad de los complejos ciclina D1-CDK4 (Pinyol et al., 2007). Como alternativa a la pérdida de *INK4a*, el gen *BMI1* puede estar amplificado y/o altamente expresado en algunos casos de MCL (Beà et al., 2001). Este gen reprime la transcripción de *CDKN2A*. El locus *CDKN2A* también codifica para *ARF*, el cual regula negativamente *MDM2*, que a su vez, promueve la degradación de p53 (Hernández et al., 2005). Estas alteraciones y mutaciones de *TP53* conducen a la desregulación de la vía de p53 y los elementos regulados por él (Hernández et al., 2005). Una de las implicaciones de su delección sería la pérdida de inhibición de CDK mediante p21. Además, el gen *ATM*, un regulador de inestabilidad cromosómica, esta frecuentemente delecionado y mutado en MCL, un evento asociado a casos con gran número de alteraciones (Salaverria et al., 2008a; Salaverria et al., 2007; Camacho et al., 2002). En este sentido, *CHK1*

y *CHK2*, dianas de *ATM*, también se encuentran ocasionalmente desreguladas en MCL (Figura 13) (Tort et al., 2002; Tort et al., 2005).

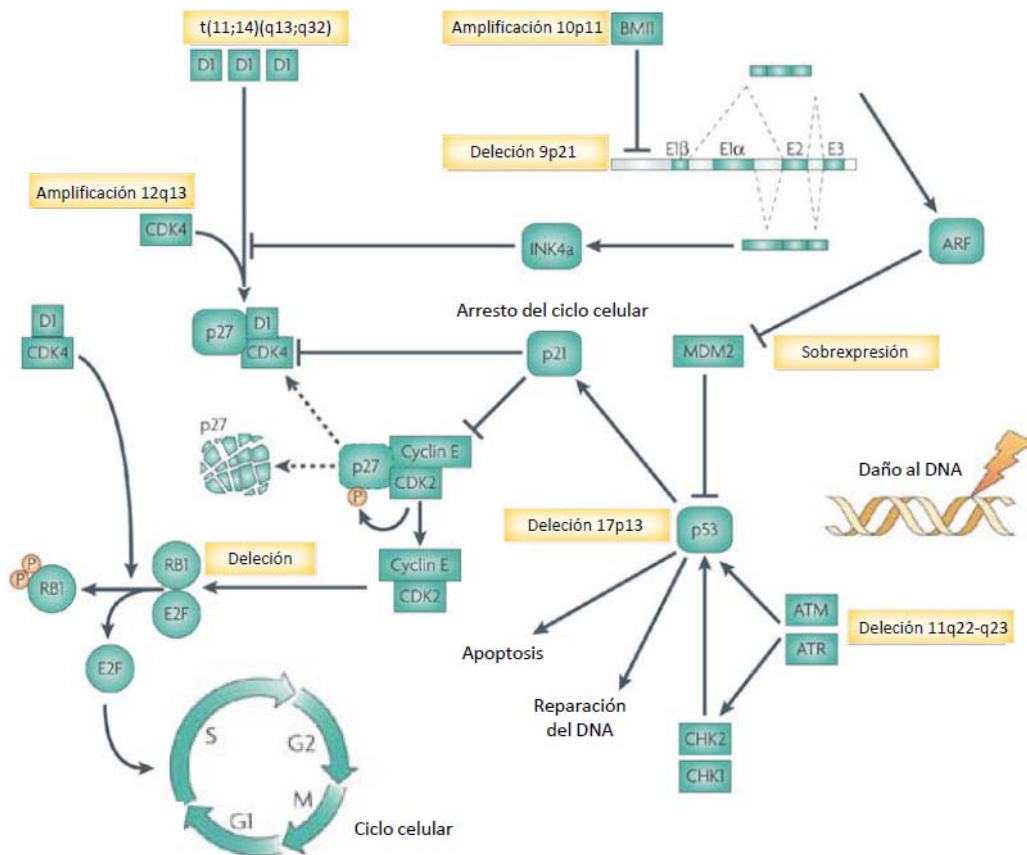


Figura 13. Alteraciones del ciclo celular y de la respuesta al daño al DNA en el MCL (Jares et al., 2007).

2.5.2. Otras vías afectadas

La vía de supervivencia celular y las alteraciones en la apoptosis ocurren en MCL mediante la amplificación/sobrexpresión de *BCL2* (18q21) y deleciones homocigotas del gen proapoptótico *BCL2L11* (*BIM* en 2q13) (Hartmann et al., 2010). Algunos inhibidores de la vía del NF- κ B son dianas de deleciones bialélicas (*FAF1* en 1p32.3) (Hartmann et al., 2010) o de alteraciones inactivantes (delección, mutación o hipermetilación) de *TNFAIP3/A20* asociadas a deleciones de 6p23 (Hartmann et al., 2010; Honma et al., 2009).

La vía de señalización *Hippo* es importante en proliferación celular y en desarrollo del cáncer (Hartmann et al., 2010). Aproximadamente el 40% de los MCL tienen deleciones y menor

expresión de *MOBK2B*, *MOBK2A* y *LATS1*, localizados en 9p, 19p y 6q24-q25 respectivamente, asociado a una proliferación elevada, gran complejidad genómica y baja supervivencia (Hartmann et al., 2010).

Las proteínas de asociación a microtúbulos (MAPs) pueden encontrarse amplificadas en algunos casos puntuales, como *MAP6* en 11q13, o delecionadas/metiladas parcialmente como *MAP2* en 2q34, sugiriendo que alteraciones en la dinámica de microtúbulos pueden contribuir a la inestabilidad cromosómica y a la formación de cariotipos complejos (Vater et al., 2009).

2.6. Periodo de latencia del MCL y curso clínico indolente

Los procesos oncogénicos desde el evento inicial hasta el desarrollo del MCL no se conocen bien y pueden conllevar la adquisición de alteraciones genéticas secundarias y la activación de vías adicionales que faciliten la progresión de clones malignos. A pesar de que la gran mayoría de pacientes con MCL se presentan con linfadenopatías generalizadas y siguen una evolución clínica agresiva, se ha observado recientemente en algunos pacientes que este proceso puede tener un periodo de latencia largo y probablemente no todas las células que adquieran la translocación inicial evolucionarán a un linfoma maligno. Se han descrito células que tienen la translocación t(11;14) a muy bajos niveles en la sangre periférica del 8% de los individuos sanos. Estos clones pueden persistir durante un largo periodo de tiempo, de entre 7 y 9 años (Lecluse et al., 2009). Sin embargo, la elevada frecuencia de su presencia en individuos sanos comparado con la baja incidencia de MCL en la población sugiere que no todos estos clones progresarán a una neoplasia maligna. El largo periodo de latencia de los clones iniciales requerido antes de desarrollar el linfoma, se ha puesto de manifiesto en un estudio en el que un donante y su receptor desarrollaron simultáneamente un MCL con el mismo origen **clonal**, después del trasplante alogénico de médula ósea llevado a cabo 12 años antes (Christian et al., 2010). Además, un estudio retrospectivo en 7 pacientes con MCL identificó un MCL *in situ* en biopsias previas obtenidas entre 2 y 15 años antes de el desarrollo del MCL clínico, confirmando la idea de un largo periodo de latencia desde el inicio hasta el desarrollo de la enfermedad clínica sintomática (Racke et al., 2010).

Se ha observado que algunos pacientes diagnosticados de MCL pueden tener un curso clínico indolente, con una supervivencia larga de más de 7-10 años, y algunos de ellos sin necesidad de quimioterapia durante largos periodos (Espinete et al., 2005; Martin et al., 2009; Nodit et al., 2003; Orchard et al., 2003; Rule et al., 2011). Estos pacientes comparten algunas características clínicas, genéticas y moleculares, que los diferencian de los MCL agresivos. Estos

tumores se presentan con leucemia y esplenomegalia y predominantemente sin afectación ganglionar (Orchard et al., 2003, Angelopoulou et al., 2002). Estas formas indolentes de MCL también presentan llamativamente un cariotipo simple sin otras alteraciones cromosómicas además de la t(11;14), y un número alto de mutaciones somáticas en los genes *IGHV* (Fernández et al., 2010; Orchard et al., 2003) (Tabla 3).

Tabla 3. Resumen de los rasgos de la patogénesis del MCL en sus dos variantes de presentación clínica.

MCL agresivo (70-90%) (Supervivencia de 3-5 años)	MCL indolente (10-30%) (Supervivencia de 7-10 años)
<ul style="list-style-type: none"> • Presentación clínica: nodal con morfología clásica y blastoide • Muchas alteraciones=inestabilidad genómica • <i>IGHV</i> no mutadas 	<ul style="list-style-type: none"> • Presentación clínica: no nodal, leucémica, esplenomegalia • Cariotipo simple=estabilidad genómica • <i>IGHV</i> mutadas

Todos estos tumores de curso clínico indolente contenían la translocación t(11;14) y expresaban ciclina D1, pero las diferencias en cuanto a la presentación clínica y el comportamiento indolente, hizo cuestionarse si realmente eran MCL o podían corresponder a otros subtipos de linfomas esplénicos o leucémicos. Para responder esta pregunta, en un estudio se comparó el perfil de expresión génica de un grupo de MCL leucémico indolente que no necesitó tratamiento durante un mínimo de 2 años con un grupo de MCL convencional y otras neoplasias linfoides de célula B con afectación leucémica.

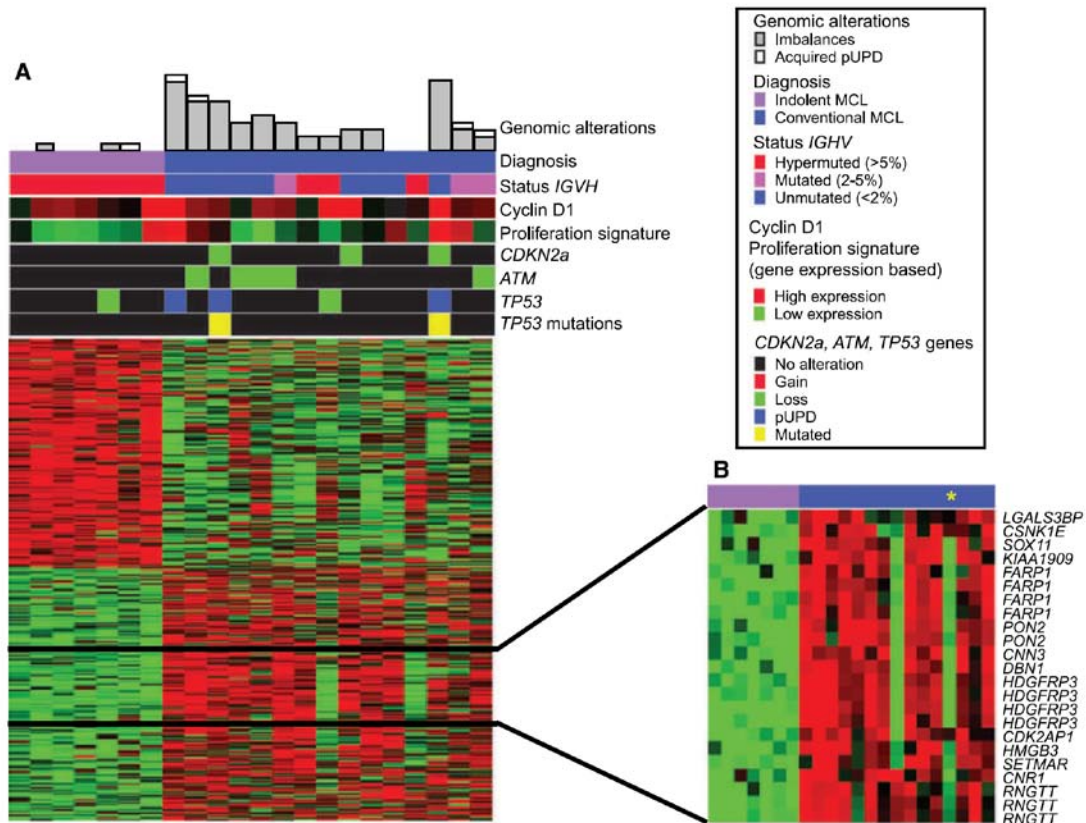


Figura 14. Caracterización de MCL indolentes de acuerdo con sus características genéticas y moleculares. La complejidad genómica en el diagrama de barras en la parte superior, reflejando el número de alteraciones de cada caso. Justo debajo, el diagnóstico, en violeta el MCL indolente y en azul el MCL convencional. En el diagrama la alta expresión está representada en rojo y la baja en verde. (B) Representación de las sondas que mostraron expresión diferencial significativa entre los MCL indolentes y convencionales.

Los MCL indolentes fueron molecularmente más similares a los MCL convencionales que a otros tipos de neoplasias linfoides, respaldando la idea de que corresponden a la misma entidad. Además, en este mismo estudio se identificó una firma de 13 genes que se sobreexpresaban en MCL convencional pero que no se expresaban en MCL indolente. Estos genes fueron: *LGALS3BP*, *CSNK1E*, *SOX11*, *KIAA1909*, *FARP1*, *PON2*, *CNN3*, *DBN1*, *HDGFRP3*, *CDK2AP1*, *HMGB3*, *SETMAR*, *CNR1* y *RNGTT* (Figura 14)(Fernández et al., 2010).

El reconocimiento de estos pacientes con curso clínico indolente es importante para que se puedan beneficiar de estrategias de tratamiento más conservadoras y ajustadas a la biología del tumor sin que resulte perjudicada la salud de los pacientes debido a las altas dosis de quimioterapia a las que están sometidos frecuentemente.

2.7. Importancia de SOX11 como marcador del MCL

SOX11, uno de los 13 genes diferencialmente expresados entre MCL convencional e indolente, es un factor de transcripción que en condiciones normales está involucrado en la neurogénesis embrionaria y en la remodelación tisular. Se ha demostrado la ausencia de su expresión en el cerebro adulto y en muchos otros tejidos adultos como son el bazo, el timo, la próstata, los testículos, los ovarios, el intestino delgado, el colon, los leucocitos de sangre periférica, el corazón, el cerebro, la placenta, el pulmón, el hígado, el músculo esquelético, el riñón y el páncreas (Jay et al., 1995). Recientemente, *SOX11* se ha encontrado sobreexpresado en neoplasias linfoides como en MCL (Fernández et al., 2010; Ek et al., 2008) y en gliomas malignos (Weigle et al., 2005).

Inicialmente, en un estudio de *SOX11* en neoplasias linfoides se observó que su expresión se localizaba específicamente en el núcleo de las células del MCL pero era negativo en otros linfomas y en todos los tejidos linfoides benignos (Ek et al., 2008). En un estudio posterior, la expresión nuclear de *SOX11* se encontró en la mayoría de casos de leucemia/linfoma linfoblástico B y T, y en un tercio de los BL pediátricos, y una expresión muy débil en algunos casos de HCL (Dictor et al., 2009). Más adelante, se examinó *SOX11* en 211 casos de neoplasias B por IHQ, y evaluó su asociación con la t(11;14) y la sobreexpresión de ciclina D1 (Chen et al., 2010). La tinción nuclear de *SOX11* en MCL se observó en el 95% de los casos y dos de los tres casos negativos para *SOX11* eran positivos para la t(11;14). Todos los otros linfomas B mostraron tinción variable citoplasmática pero no nuclear. La tinción nuclear de *SOX11* fue totalmente negativa en muestras de mieloma múltiple (MM) en los que se incluían casos con la t(11;14). Por otro lado, se observó expresión nuclear intensa de *SOX11* en el 50% de los casos de HCL, y estos mismos casos mostraban sobreexpresión de ciclina D1. El otro 50% sin expresión de ciclina D1 mostró un patrón granular de *SOX11* exclusivamente citoplasmático (Chen et al., 2010). Con estas observaciones, se pudo hipotetizar que la expresión nuclear de *SOX11* en la HCL parece estar relacionada con la expresión de ciclina D1, pero es independiente de la presencia de la t(11;14).

2.7.1. Características del gen *SOX11*

El gen *SOX11* consta solamente de un exón, se encuentra localizado en el cromosoma 2 (2p25.3), y es uno de los alrededor de 20 genes de la familia *SOX* identificados en humanos.

Los genes *SOX* (SRY-related HMG box) contienen un dominio high movility group (HMG) box que fue identificado por primera vez en el gen *SRY*, sex-determining region del cromosoma Y (involucrado en la determinación del sexo). Los genes *SOX* codifican para un grupo de factores de transcripción (Figura 15) que se unen al surco menor del DNA. Gracias a su dominio HMG, tienen una gran afinidad y especificidad de unión al DNA al interactuar con muchos tipos de factores de transcripción. Además, debido a su estructura conformacional (3 hélices alfa en forma de L y una hélice beta N terminal), el dominio HMG es capaz de doblar la hélice del DNA aumentando la accesibilidad de proteínas, y confiriendo así a los genes *SOX* un papel único y crítico en el ensamblaje de promotores transcripcionales (Lefebvre et al., 2007). Los genes *SOX* pertenecen a una superfamilia de genes caracterizada por una secuencia homóloga que está altamente conservada en los eucariotas (Wegner et al., 2007). En general, juegan un papel crítico en la determinación del destino celular y en la diferenciación en muchos procesos como son la diferenciación del sexo, la formación del esqueleto o el mantenimiento de las células en estadios desdiferenciados (Wegner et al., 2007; Kiefer et al., 2007; Lefebvre et al., 2007). Se dividen en 8 grupos (A-H), según su grado de homología dentro y fuera del dominio HMG.

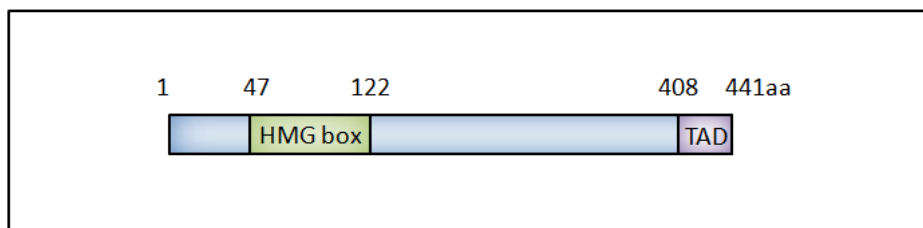


Figura 15. Esquema de la proteína *SOX11* (441 aminoácidos) y sus dominios funcionales. El dominio de unión al DNA es el HMG box, y la TAD es el dominio de transactivación.

SOX11 pertenece al subgrupo C, el cual contiene tres miembros: *SOX4*, *SOX11* y *SOX12*. Estos tres genes se coexpresan en progenitores neuronales embrionarios y en **células mesenquimales** de muchos órganos en desarrollo (Dy et al., 2008; Penzo-Méndez et al., 2010). Ambos, *SOX11* y *SOX4* están intensamente expresados en la mayoría de meduloblastomas, oligodendriomas anaplásicos y glioblastomas (Lee et al., 2002; Weigle et al., 2005), y juegan un papel importante en desarrollo de procesos neuronales y cardíacos, pero su función molecular así como la función de *SOX12* aún es desconocida.

Se han realizado estudios funcionales en ratones, y en cultivos celulares primarios que han observado la dependencia de *SOX11* en la supervivencia neuronal y el crecimiento de neuritas (Jankowski et al., 2006). El papel de *SOX11* en la remodelación tisular también se ha estudiado

en modelos murinos con *SOX11* inactivo que han mostrado varias malformaciones, indicando que *SOX11* es importante para la remodelación tisular y que las mutaciones de *SOX11* en humanos podrían estar asociadas a síndromes relacionados con malformaciones (Sock et al., 2004).

SOX4, miembro del mismo grupo que *SOX11*, es el único gen de la familia de *SOX* del que se conoce un papel importante en el desarrollo temprano de células B y T (Wetering et al., 1993; Schilham et al., 1996). El desarrollo de células B se bloquea en el estadio pro-B en los ratones deficientes en *SOX4* (Schilham et al., 1996). A pesar de la similitud de *SOX4* y *SOX11*, con un 55% de identidad a nivel de aminoácidos dentro del dominio TAD del C-terminal, y el 86% de identidad en el dominio de unión al DNA HMG box, su papel en linfopoyesis aún no se conoce.

Se ha demostrado también que los cambios epigenéticos pueden ser responsables de la modulación de la expresión de *SOX11* en MCL, algunas ALL y en algunos casos de BL. La desregulación de la expresión de *SOX11* está asociada a la hipometilación del DNA y a la presencia de marcas de histonas activantes (H3K9/14Ac y H3K4me3). En cambio, la represión está asociada a marcas de silenciamiento de las histonas H3K9me2 y H3K27me3 independientemente de la presencia o ausencia de metilación en el promotor del gen (Vegliante et al., 2011).

2.8. Pronóstico del MCL

La evolución clínica de los pacientes es relativamente agresiva, con una supervivencia media de 3-5 años. En los últimos años la remisión completa de los pacientes después del tratamiento ha aumentado, aunque las recaídas al poco tiempo son aún muy frecuentes. Diversos estudios han resaltado la proliferación celular como el mejor parámetro biológico para valorar el pronóstico de los pacientes con MCL. Inicialmente, los patólogos describieron el índice mitótico (proporción de células en mitosis respecto a las que están en interfase) (Tiemann et al., 2005) para cuantificar la proliferación. Posteriormente, el marcador Ki67, que por sí solo estratifica a los pacientes de MCL en cuanto a supervivencia según los distintos niveles de proliferación (Katzenberger et al., 2006, Tiemann et al., 2005), y por último, se describió la firma de proliferación mediante *arrays* que cuantifica la expresión de genes relacionados con la proliferación con los que se predice la supervivencia (Rossenwald et al., 2003). Posteriormente, se añade el pronóstico basado en parámetros clínicos como el IPI. Al analizar casos de MCL con el IPI, se observó que no era un predictor óptimo y se propuso la creación de un nuevo índice específico para MCL llamado MIPI (Hoster et al., 2008). Éste se

basa en la edad, el **ECOG**, niveles de LDH y recuento de leucocitos (WBC), que según sus valores estratifican a los pacientes en tres grupos pronóstico: riesgo bajo, intermedio o alto. Además, se ha visto que combinando el marcador de proliferación **Ki67**, se añade fuerza a la capacidad pronóstica mostrando un grupo de bajo riesgo con un relativo buen pronóstico (Räty et al., 2002). Para cada factor pronóstico, se dan de 0 a 3 puntos, y se suman los puntos para estos 4 factores dando un máximo de 11 puntos. Los pacientes que en la suma final tienen 0-3 puntos, se clasifican como riesgo bajo, con 4-5 puntos como riesgo intermedio, y con 6-11 puntos como riesgo alto. Además, la presencia de la variante morfológica blastoide es indicativa de mal pronóstico (Bosch et al., 1998; Rosenwald et al., 2003).

En un análisis más extenso, resulta de mucha utilidad la inclusión de características genéticas y moleculares indicativos de mal pronóstico como son el número elevado de alteraciones cromosómicas (Beà et al., 1999; Salaverria et al., 2007; Allen et al., 2002; Katzenberger et al., 2008) y el tipo de alteraciones cariotípicas que se detallan a continuación (Tabla 4).

Tabla 4. Alteraciones genómicas recurrentes detectadas mediante hibridación genómica comparada (CGH), *arrays* de CGH o de SNP, con significado pronóstico en MCL.

Referencia	+3q	-8p	-9p	-9q	+12q	-13q	-17p
Katzenberger, 2008	-	-	9p21	-	-	13q14, 13qter	-
Espinet, 2010	3q	-	-	-	-	13q	17p13
Parry-Jones, 2007	-	-	-	-	-	13q14, 13q	-
Beà, 1999	3q27-q29	-	9p	-	12q	-	-
Martinez-Climent, 2001	-	8p	-	-	-	-	-
Allen, 2002	-	-	-	-	-	-	17p
Salaverria, 2007	3q27-qter	8p21	9p21	9q21	-	-	-
Flordal, 2007	3q	-	-	-	-	-	-
Kohlhammer, 2004	-	8p21	-	-	-	13q14	-
Rubio-Moscardo, 2005	-	-	9p21.3	9q21	-	-	17p13
Hartmann, 2010	-	-	9p21.3	-	12q14	-	-

Estas alteraciones afectan a dianas concretas como *CDKN2A* (9p21), *CDK4* (12q13-q14) o *TP53* (17p13). La delección de 17p, 9q y la ganancia 3q son alteraciones independientes de proliferación asociadas a mal pronóstico (Salaverria et al., 2007; Espinet et al., 2010).

2.9. SOX11 y pronóstico en MCL

Un estudio de la expresión proteica de SOX11 en MCL confirmó que su negatividad estaba asociada predominantemente a la ausencia de afectación ganglionar y a una supervivencia significativamente mejor que los casos que mostraban positividad para SOX11 (Fernández et al., 2010). Estos hallazgos sugirieron que los MCL indolentes con afectación leucémica, predominantemente no-ganglionar, y frecuentemente asociado a esplenomegalia, podía corresponder a un subtipo molecular distinto de MCL. Algunos pacientes con presentación leucémica y no-ganglionar pueden progresar hacia un comportamiento agresivo tras años de enfermedad estable. Por otro lado, algunos pacientes negativos para SOX11 pueden presentar un comportamiento clínico agresivo desde el diagnóstico (Wang et al., 2008). Estos hallazgos aparentemente contradictorios necesitan ser confirmados y valorar cuál es exactamente el papel de SOX11 en estos casos. De todas formas, estos estudios parecen indicar que SOX11, además de ser un marcador de MCL, también posee información relacionada con la clínica y el comportamiento en la biología del MCL.

El anticuerpo de SOX11 para evaluar su expresión mediante IHQ da buenos resultados por lo que su aplicación se está extendiendo para confirmar el diagnóstico de MCL (Ek et al., 2008; Chen et al., 2009; Dictor et al., 2009). Sin embargo, una gran proporción de pacientes de MCL tiene presentación leucémica (Ferrer et al., 2007), y en algunos casos, principalmente los de clínica indolente, se presentan sin afectación ganglionar. Este hecho hace que SOX11 no pueda ser evaluado mediante IHQ por la falta de tejido y se requieran otros métodos para analizar SOX11 en células de sangre periférica.

2.10. Tratamiento del MCL

El MCL es uno de los linfomas de célula B más difíciles de tratar. Aunque la quimioterapia convencional produce tasas altas de remisión de la enfermedad, las recaídas a los pocos años son frecuentes (Martin et al., 2008; Herrmann et al., 2009). El tipo de tratamiento a escoger para cada paciente depende de la edad, la salud y el estadio de la enfermedad.

Los regímenes de quimioterapia convencionales se basan en la combinación Rituximab-CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona) (Schulz et al., 2007) o hyperCVAD (hiper ciclofosfamida fraccionada, vincristina, doxorubicina, dexametasona, citarabina y metotrexato) en combinación con Rituximab (Witzig et al., 2005). Frecuentemente, estos tratamientos son seguidos de trasplante de médula ósea, ya que queda dañada por las dosis

altas de quimioterapia. El trasplante puede ser alogénico, en el que el paciente recibe médula ósea de otra persona, o autólogo en el que el paciente recibe sus propias células (Figura 16).

En los últimos años se han desarrollado nuevas estrategias más dirigidas a moléculas o vías cruciales de la biología tumoral; 1) Los agentes alquilantes, como la Bendamustina, inducen daño en el DNA y por tanto, la muerte celular; 2) Los antimetabolitos, como la Gemcitabina, interfieren en el crecimiento celular; 3) Las terapias dirigidas a BCL2 con el fin de bloquearlo para que deje de proteger a la célula tumoral de la muerte celular; 4) Las drogas inmunomodulatorias, como Lenalidomida y Talidomida, activan una respuesta del sistema inmune del paciente contra las células tumorales; 5) Finalmente, los inhibidores de mTOR, como Temsirolimus, previenen el crecimiento celular e incluso la muerte celular, dado que esta vía se encuentra excesivamente activada en MCL. Todos los tratamientos anteriores están bajo investigación y se están probando en combinación con otras drogas para una mayor efectividad (Pérez-Galan et al., 2011; Dreyling et al., 2011).

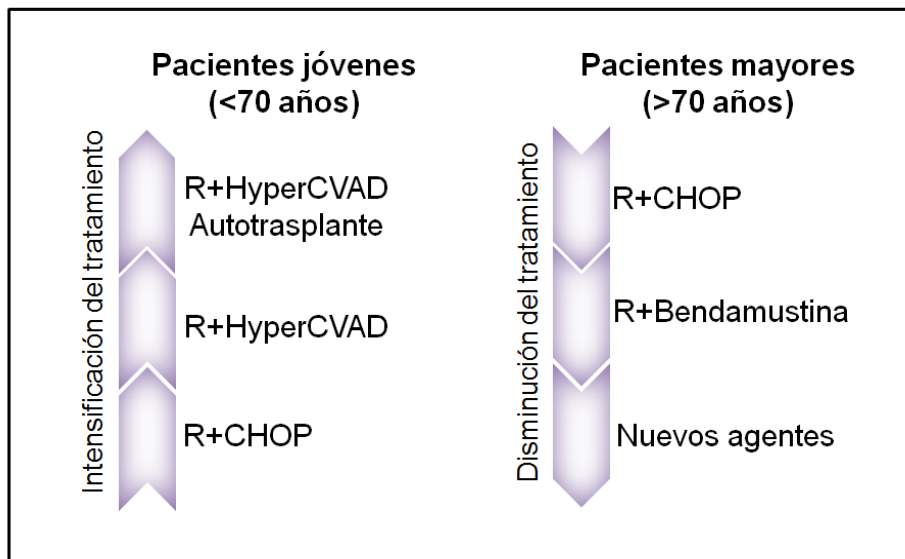


Figura 16. Pautas de tratamiento en MCL. El tratamiento en pacientes jóvenes aumenta en intensidad con el objetivo de erradicar la enfermedad. En pacientes mayores, al tener una tolerancia de tratamiento menor, se aplican nuevos agentes en el mantenimiento y en la recaída (Shah et al., 2012).

2.11. Diagnóstico diferencial del MCL

Como esta tesis está centrada en MCL y en marcadores específicos para su reconocimiento, es importante saber los aspectos que pueden confundir esta neoplasia con otras de características similares. Morfológicamente, el contorno nuclear de las células neoplásicas de

MCL puede variar sustancialmente entre casos, desde una morfología nuclear redondeada, muy ligeramente irregular, similar a la CLL, o marcadamente irregular similar a los **centrocitos** del FL. Pero también puede ocurrir que algunos casos de CLL tengan el núcleo irregular como el MCL (Oliveira et al., 1989) o el MZL (Isaacson et al., 2003). El marcador CD23 se expresa en CLL pero también en casos ocasionales de MCL (Schlette et al., 2003). La expresión de CD5 y CD43, es típica de MCL y CLL, pero también puede ocurrir en MZL (Campo et al., 1999b). Algunos MCL pueden presentar marcadores de centro germinal CD10 y BCL6 (Camacho et al., 2004; Zanetto et al., 2008).

La detección de la ciclina D1 mediante inmunohistoquímica (IHQ) o PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) es una herramienta muy útil para establecer un diagnóstico diferencial entre MCL y otros linfomas de células B maduros con morfología similar y CD5+. Sin embargo, el 40% del MM (Bergsagel et al., 2003) y la HCL (Boer et al., 1996) expresan ciclina D1 debido a varios mecanismos (translocación t(11;14), **hiperploidía**, o por activación global del ciclo celular). Además, existe la variante de MCL que no expresa ciclina D1, por lo que resulta muy difícil de diagnosticar.

En ocasiones, desde el punto de vista clínico, los pacientes de MCL se han diagnosticado erróneamente como CLL al presentar una neoplasia de clínica indolente caracterizada por una linfocitosis, y por presentar linfocitos pequeños y relativamente redondeados. El correcto diagnóstico de MCL se establece en el momento en que se realizan estudios genéticos y moleculares y se detecta la t(11;14).

La variante blástica de MCL se compone de células de tamaño medio con cromatina nuclear eventualmente dispersa y una tasa mitótica alta imitando al LBL/ALL. Sin embargo, los pacientes con la variante blástica tienen normalmente una edad más avanzada que los LBL/ALL. Los estudios inmunofenotípicos son útiles ya que los pre-B ALL/LBL expresan TdT y son negativos para IG de superficie y ciclina D1.

La variante pleomórfica de MCL se compone de células medianas-grandes, algunas de ellas tienen cromatina vesicular o nucléolo prominente y una tasa mitótica alta. Clínicamente, aproximadamente la mitad de los DLBCL presentan enfermedad localizada que puede ser **bulky**, cosa que no ocurre con los pacientes de MCL. Normalmente, se requieren estudios de diversos marcadores por IHQ o moleculares para distinguir el DLBCL de la variante pleomórfica del MCL. Los DLBCL son ciclina D1 negativos, normalmente CD5 negativos y no tienen la translocación t(11;14) (Ioachim, 2009).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

El linfoma de células del manto (MCL) es una neoplasia clínica y biológicamente heterogénea. La caracterización de los tumores que no presentan la alteración genética principal, la t(11;14), y el subgrupo de MCL con presentación clínica indolente será importante para conocer mejor la biología tumoral, mejorar la capacidad diagnóstica y pronóstica, y permitir que los pacientes se beneficien de los tratamientos más adecuados en cada subtipo de patología.

OBJETIVOS

1 Caracterización genética y molecular del subgrupo de linfomas del manto que no tiene la translocación t(11;14)(q13;q32), y no expresa ciclina D1 al carecer de la alteración genética principal de este linfoma.

1.a Definir el posible valor de *SOX11* como biomarcador en el diagnóstico del subgrupo de MCL ciclina D1 negativo.

1.b Determinar si alteraciones de los genes de la ciclina D2 y D3 pueden ser mecanismos oncogénicos alternativos en los MCL ciclina D1 negativos.

1.c Analizar si las alteraciones genómicas secundarias de los MCL ciclina D1 negativos son similares a las de los MCL ciclina D1 positivos.

1.d Definir las características clinicopatológicas de los MCL ciclina D1 negativos y determinar si son similares a los pacientes con MCL convencional que expresan ciclina D1.

2 Caracterización del subgrupo de MCL leucémico generalmente sin afección ganglionar que presenta una clínica indolente con larga supervivencia.

2.a Desarrollar una herramienta de diagnóstico sencilla mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) que permita identificar el subgrupo de MCL con un curso indolente en muestras de sangre periférica.

2.b Determinar si la expresión de los genes que distinguen los MCL convencionales de los que siguen un curso clínico indolente es estable en el tiempo.

2.c Estudiar el perfil de alteraciones genéticas y la complejidad genómica de los MCL indolentes y convencionales mediante plataformas de alta densidad SNP-*arrays*.

2.d Determinar las características clinicopatológicas de los MCL en función de la expresión de los genes diferencialmente expresados entre las formas clínicas indolentes y convencionales.

RESULTADOS

TRABAJO N°1

La expresión de SOX11 es altamente específica del linfoma de células del manto e identifica el subtipo ciclina D1 negativo

(Haematologica 94:1555-62, 2009)

RESUMEN

La expresión de SOX11 es altamente específica del linfoma de células del manto e identifica el subtipo ciclina D1 negativo

El linfoma de células del manto (MCL) ciclina D1 negativo es difícil de distinguir de otros linfomas B de célula pequeña. Las características clínicas y patológicas de los pacientes con este tipo de linfoma no están bien definidas. La sobreexpresión del factor de transcripción *SOX11* se ha observado en el MCL convencional. El objetivo de este estudio era determinar si dicho gen se expresa en el MCL ciclina D1 negativo y si su detección puede resultar de utilidad para identificar estos tumores. Se reanalizaron 238 neoplasias de célula B madura de una base de datos de *arrays* de expresión. La expresión proteica de *SOX11* se investigó mediante inmunohistoquímica en 12 casos de MCL ciclina D1 negativo, 54 casos de MCL convencional, y 209 neoplasias linfoides adicionales. Observamos que el mRNA de *SOX11* estaba altamente expresado tanto en los casos con MCL convencional como en los ciclina D1 negativo y en un 33% de los casos de linfoma de Burkitt, pero no en otras neoplasias linfoides maduras. La proteína nuclear *SOX11* fue detectada en 50 casos (93%) de los MCL convencionales y también en los 12 MCL ciclina D1 negativo, en los 6 casos de linfoma linfoblástico, en 2/8 casos de linfoma de Burkitt, en 2/3 leucemias prolinfocíticas T, y fue negativo en el resto de neoplasias linfoides. Los niveles de mRNA de ciclina D2 y D3 fueron significativamente más altos en los MCL ciclina D1 negativo que en los MCL convencionales, pero la expresión proteica no era discriminativa. Las características clínicopatológicas y la supervivencia de los pacientes con MCL ciclina D1 negativo identificados por la expresión de *SOX11* fueron similares a los pacientes con MCL convencional. En conclusión, *SOX11* es un marcador altamente específico que detecta mRNA y expresión proteica nuclear tanto en el MCL ciclina D1 positivo como negativo.

SOX11 expression is highly specific for mantle cell lymphoma and identifies the cyclin D1-negative subtype

Ana Mozos,¹ Cristina Royo,¹ Elena Hartmann,² Daphne De Jong,³ Cristina Baró,⁴ Alexandra Valera,¹ Kai Fu,⁵ Dennis D. Weisenburger,⁵ Jan Delabie,⁶ Shih-Sung Chuang,⁷ Elaine S. Jaffe,⁸ Carmen Ruiz-Marcellan,⁹ Sandeep Dave,¹⁰ Lisa Rimsza,¹¹ Rita Braziel,¹² Randy D. Gascoyne,¹³ Francisco Solé,⁴ Armando López-Guillermo,¹ Dolores Colomer,¹ Louis M. Staudt,⁸ Andreas Rosenwald,¹⁴ German Ott,¹⁴ Pedro Jares,¹ and Elias Campo¹

¹Hematopathology Section, Department of Pathology and Hematology, Hospital Clinic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Spain; ²Institute of Pathology, University of Würzburg, Würzburg, Germany; ³Department of Pathology, The Netherlands Cancer Institute/Antoni von Leeuwenhoek Hospital, Amsterdam, The Netherlands; ⁴Laboratory of Molecular Cytogenetics, Department of Pathology, Hospital del Mar, Barcelona, Spain; ⁵Department of Pathology and Microbiology, University of Nebraska Medical Center, Omaha; ⁶Department of Pathology, Norwegian Radium Hospital, Oslo, Norway; ⁷Department of Pathology, Chi-Mei Medical Center, Tainan, Taiwan; ⁸Section of Hematopathology and Lymphoma Clinical Research, Center for Cancer Research, Division of Cancer Treatment and Diagnosis, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, USA; ⁹Department of Pathology, Vall d'Hebron University Hospital, Autonomous University of Barcelona, Spain; ¹⁰Duke Institute for Genome Sciences and Policy, Duke University, Durham, North Carolina, USA; ¹¹Department of Pathology, The University of Arizona College of Medicine, Tucson, Arizona, USA; ¹²Department of Pathology, Oregon Health and Science University, USA; ¹³Department of Pathology & Laboratory Medicine, University of British Columbia, Vancouver, Canada, and ¹⁴Institut für Klinische Pathologie, Robert-Bosch-Krankenhaus, Stuttgart, Germany

Acknowledgments: the authors would like to thank Wing C. Chan and Manisha Bahl for their comments and suggestions during the development of the project.

Funding: this study was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation SAF 2008-03630, Instituto de Salud Carlos III "Red Temática de Investigación Cooperativa de Cáncer" (2006RET2039) and Acción Transversal (V-2008-ISCIII01) and the National of Health (5U01CA114778-03). AR and EMH are supported by the Interdisciplinary Center for Clinical Research (IZKF), University of Würzburg, Germany.

Manuscript received April on 16, 2009. Revised version arrived on May 15, 2009. Manuscript accepted on May 19, 2009.

Correspondence: Elias Campo, MD, PhD, Department of Pathology, Hospital Clinic, Villarroel 170, Barcelona 08036, Spain. E-mail: ecampo@clinic.uib.es

ABSTRACT

Background

Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma is difficult to distinguish from other small B-cell lymphomas. The clinical and pathological characteristics of patients with this form of lymphoma have not been well defined. Overexpression of the transcription factor *SOX11* has been observed in conventional mantle cell lymphoma. The aim of this study was to determine whether this gene is expressed in cyclin D1-negative mantle cell lymphoma and whether its detection may be useful to identify these tumors.

Design and Methods

The microarray database of 238 mature B-cell neoplasms was re-examined. *SOX11* protein expression was investigated immunohistochemically in 12 cases of cyclin D1-negative mantle cell lymphoma, 54 cases of conventional mantle cell lymphoma, and 209 additional lymphoid neoplasms.

Results

SOX11 mRNA was highly expressed in conventional and cyclin D1-negative mantle cell lymphoma and in 33% of the cases of Burkitt's lymphoma but not in any other mature lymphoid neoplasm. *SOX11* nuclear protein was detected in 50 cases (93%) of conventional mantle cell lymphoma and also in the 12 cyclin D1-negative cases of mantle cell lymphoma, the six cases of lymphoblastic lymphomas, in two of eight cases of Burkitt's lymphoma, and in two of three T-prolymphocytic leukemias but was negative in the remaining lymphoid neoplasms. Cyclin D2 and D3 mRNA levels were significantly higher in cyclin D1-negative mantle cell lymphoma than in conventional mantle cell lymphoma but the protein expression was not discriminative. The clinico-pathological features and outcomes of the patients with cyclin D1-negative mantle cell lymphoma identified by *SOX11* expression were similar to those of patients with conventional mantle cell lymphoma.

Conclusions

SOX11 mRNA and nuclear protein expression is a highly specific marker for both cyclin D1-positive and negative mantle cell lymphoma.

Key words: mantle cell lymphoma, cyclin D1, *SOX11*.

Citation: Mozos A, Royo C, Hartmann E, De Jong D, Baró C, Valera A, Fu K, Weisenburger DD, Delabie J, Chuang S-S, Jaffe ES, Ruiz-Marcellan C, Dave S, Rimsza L, Braziel R, Gascoyne RD, Solé F, López-Guillermo A, Colomer D, Staudt LM, Rosenwald A, Ott G, Jares P, and Campo E. SOX11 expression is highly specific for mantle cell lymphoma and identifies the cyclin D1-negative subtype. Haematologica 2009; 94:1555-1562. doi:10.3324/haematol.2009.010264

©2009 Ferrata Storti Foundation. This is an open-access paper.

Introduction

Mantle cell lymphoma (MCL) is an aggressive lymphoid neoplasm genetically characterized by the presence of the t(11;14)(q13;q32) translocation that activates constitutive expression of cyclin D1, an important regulator of the G₁/S phase of the cell cycle.^{1,2} In addition to this primary genetic alteration, MCL also has a relatively specific profile of secondary genetic aberrations that include frequent losses, gains and recurrent chromosomal breakpoints.³⁻⁷ In spite of the constant overexpression of cyclin D1 in MCL, some studies reported tumors with similar morphological and phenotypic characteristics but lacking the t(11;14) translocation and cyclin D1 expression.⁸ However, it was controversial whether the apparent lack of cyclin D1 was a real biological phenomenon or was due to technical limitations in its detection. Fu *et al.*⁹ described six cases of MCL that were negative for cyclin D1 and the t(11;14) translocation but had the same gene expression profile as conventional MCL. These cases also had the same profile of secondary genetic aberrations as conventional MCL and different from that of other B-cell neoplasms supporting the idea that cyclin D1-negative MCL is a real biological variant of this tumor.^{10,11}

The recognition of cyclin D1-negative MCL is difficult because it may resemble other small B-cell lymphomas morphologically and phenotypically. However, this distinction is clinically very relevant. Although the clinical information on cyclin D1-negative MCL is limited, published data indicate that the behavior of the variant is as aggressive as that of conventional MCL.¹² On the other hand, patients with small B-cell lymphomas mimicking MCL have a significantly better outcome than those with real MCL.⁸ It is, therefore, important to find reliable biomarkers that may allow the identification of cyclin D1-negative MCL in clinical practice.

Cyclin D1-negative MCL seem to express high levels of cyclin D2 or D3 which, in some cases, are associated with translocations of these genes.¹²⁻¹⁴ These cyclins are also expressed at lower levels in other B-cell lymphomas. *SOX11*, a neural transcription factor, was found to be expressed at higher levels in leukemic MCL cells than in naïve B cells and other B-cell lymphomas.^{15,16} Nuclear expression of the protein has been identified in conventional MCL but not in other lymphoid neoplasms.^{16,17} Thus, the presence of *SOX11* may be a useful identifier of cyclin D1-negative MCL. However, the spectrum of lymphoid neoplasms in previous studies was limited and no real cases of MCL negative for cyclin D1 and 11q13 rearrangements were included. The goal of our study was, therefore, to confirm the specific expression of *SOX11* in MCL and define its value as a biomarker to identify cyclin D1-negative MCL.

Design and Methods

Case selection

The six initial cases of cyclin D1-negative MCL⁹ and one case described by Chuang *et al.*¹⁸ were included in

this study. In addition, we identified five new cases that had the morphological and phenotypic features of MCL but were negative for the t(11;14) translocation and cyclin D1 expression. At least three hematopathologists reviewed these cases and confirmed the diagnosis. The clinical follow-up of five of the six patients who were alive at the time of the previous respective reports^{9,18} was updated and the clinical charts of the new patients were revised. Lymph node biopsies from these 12 cyclin D1-negative MCL cases were available for the study. For comparison, we included in the study a large series of 209 patients with other lymphomas (Table 1). The local medical ethical committee approved the study.

Microarray gene expression profiling

To evaluate the mRNA expression of *SOX11*, cyclin D1, D2, and D3 in MCL and other non-Hodgkin's lymphomas we reviewed the gene expression data generated in different studies of the Leukemia Lymphoma Molecular Profiling Project (LLMPP). The CEL files of 258 lymphomas derived from different GeneChip types were combined. One set contained 163 CEL files obtained from HU133plus 2.0 GeneChip arrays (Affimetrix, Santa Clara, USA) representing 33 cases of Burkitt's lymphoma (BL), 46 cases of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), 20 primary mediastinal B-cell lymphomas (PMBL), and 64 MCL. The second set included 75 CEL files generated with HU133A GeneChip arrays representing 44 follicular lymphomas (FL) and 31 MCL, including six cyclin D1-negative MCL. To study both sets of different chip types together, we used the function combineAffyBatch described in the Matchprobes

Table 1. SOX11 nuclear protein expression in lymphoid neoplasms.

	n	Sox11-positive (%)
Cyclin D1-negative MCL	12	12 (100%)
Mantle cell lymphoma	54	50 (93%)
Chronic lymphocytic leukemia	12	0 (0%)
Splenic marginal zone lymphoma	9	0 (0%)
Nodal marginal zone lymphoma	11	0 (0%)
Follicular lymphoma	22	0 (0%)
Diffuse large B-cell lymphoma	63	0 (0%)
Burkitt's lymphoma	8	2 (25%)*
Classical Hodgkin's lymphoma	36	1 (3%)**
NLPHL	5	0 (0%)
Multiple myeloma (cyclinD1-positive)	2	0 (0%)
B-cell lymphoblastic lymphoma/leukemia	1	1 (100%)
T-cell lymphoblastic lymphoma/leukemia	5	5 (100%)
Peripheral T-cell lymphoma, NOS	15	0 (0%)
Angioimmunoblastic T-cell lymphoma	5	0 (0%)
Hepatosplenic T-cell lymphoma	3	0 (0%)
Anaplastic large cell lymphoma (ALK+)	3	0 (0%)
Anaplastic large cell lymphoma (ALK-)	3	0 (0%)
T-cell prolymphocytic leukemia	3	2 (66%)
Extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type	3	0 (0%)

MCL: mantle cell lymphoma; NLPHL: nodular lymphocytic predominant Hodgkin's lymphoma; NOS: not otherwise specified; *three additional cases showed weak immunostaining. **the staining intensity was weak.

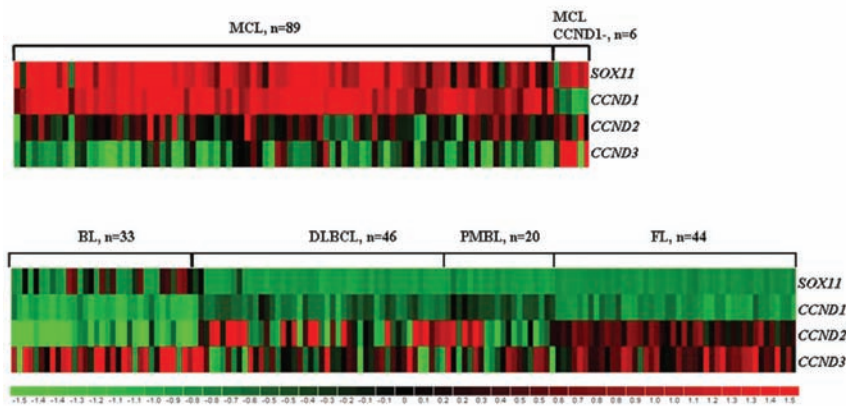


Figure 1. Heat map representing gene expression values for SOX11, CYCLIN D1 (CCND1), CYCLIN D2 (CCND2) AND CYCLIN D3 (CCND3). Cases of MCL, including CCND1-negative MCL are shown in the top half whereas other lymphoid neoplasms are displayed in the bottom half.

MCL: mantle cell lymphoma; BL: Burkitt's lymphoma; DLBCL: diffuse large B-cell lymphoma; PMBL: primary mediastinal B-cell lymphoma; FL: follicular lymphoma.

package from Bioconductor (<http://www.bioconductor.org>), which enables data from different Affymetrix genechip types to be combined into one single set merging the intensities from the matching probes. Afterwards, a single set of 238 arrays was normalized using the robust microarray analysis method. The signal value for all the probe sets corresponding to cyclin D1, cyclin D2, cyclin D3, and SOX11 were extracted from the normalized set, and the mean of all the probe sets representing the different genes was used as the final gene level expression for each gene. These data were represented in a heat map using the DNA-Chip analyzer software v1.3 (dChip, Boston, MA, USA).

Immunohistochemistry

SOX11 protein expression was studied in tissue microarrays and whole tissue sections. Formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections were stained for SOX11 (1:100; Atlas Antibodies, Stockholm, Sweden), cyclin D1 (1:100; Thermo Fisher Scientific, Runcorn, UK), cyclin D2 (1:100) and cyclin D3 (1:50) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) in the automated platform BondMax (VisionBiosystems, Mount Waverley, Victoria, Australia). We used heat-induced retrieval with ER2 BondMax buffer solution for 15 min and detected positivity with a horseradish-peroxidase-linked polymer for 8 min (Define; Vision Biosystems) and 5'-3'diaminobenzidine for 10 min.

Quantitative polymerase chain reaction

SOX11, cyclin D1, D2, and D3 mRNA expression was investigated by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) in cases not included in previous microarray expression profiling studies. Total RNA was extracted from frozen tissue samples and formalin-fixed paraffin-embedded tissue blocks using the RNeasy minikit and FFPE RNeasy minikit, respectively (Qiagen, Germantown, MA, USA). The potential residual DNA was removed using the TURBO DNA-free™ kit from Ambion (Applied Biosystems) according to the manufacturer's protocol. Complementary DNA synthesis was carried out from 1 µg of total RNA and the product was amplified and quantified using TaqMan®

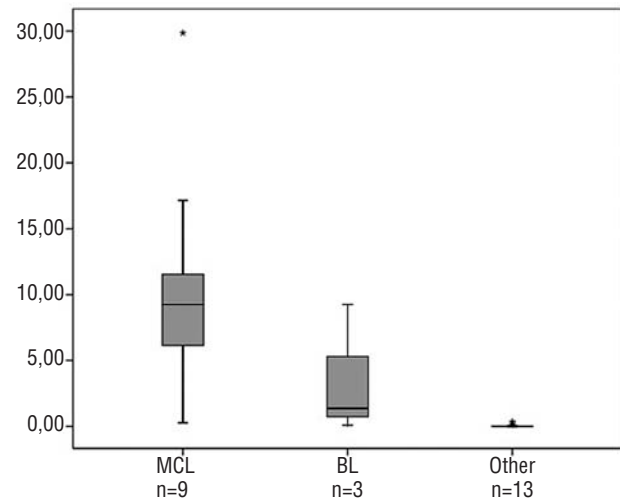


Figure 2. Quantitative RT-PCR analysis of SOX11 mRNA expression in mantle cell lymphoma (MCL), Burkitt's lymphoma (BL) and other lymphoid neoplasms (Other).

Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and TaqMan® Gene Expression Assays for SOX11 (Hs00846583_s1), CCND1 (Hs00765553_m1), CCND2 (Hs00153380_m1) and CCND3 (Hs00236949_m1) in an ABI Prism 7900HT Fast Sequence Detection System (Applied Biosystems). Relative quantification of gene expression was performed as described in the Taqman® user's manual and the expression levels were analyzed with the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method using human β -glucuronidase (*GUS*) as the endogenous control and universal human reference RNA (Stratagene, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) as the mathematical calibrator.

Using quantitative PCR, we analyzed frozen tissue obtained from nine patients with MCL, five with DLBCL, two with chronic lymphocytic leukemia, one with FL, two with splenic marginal zone lymphoma (MZL), two with nodal MZL, one with MALT MZL and three with BL. Moreover, we studied ten cyclin D1-positive and five cyclin D1-negative MCL using formalin-fixed paraffin-embedded tissue.

Fluorescence in situ hybridization

Interphase fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analysis was performed on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. The *CCND1* rearrangement was studied using a dual color break-apart probe (DAKO, Denmark code Y5414). *CCND2* and *CCND3* rearrangements were studied using dual color break-apart non-commercial translocation probes. The *CCND2* probe consisted of two bacterial artificial chromosome (BAC) clones directly labeled using nick translation. BAC RP11-578L13 located at the 5' end of the gene was labeled in green and BAC RP11-388F6 located at the 3' end of the gene was labeled in red.⁹

The *CCND3* locus was investigated using the previously described probes¹⁹ consisting of one BAC clone RP11-288J23 and three plasmid artificial chromosomes (PAC): RP5-973N23, RP1-139D8 and RP1-321B9. The BAC clones were obtained from the CHORI library (www.chori.org) available in our center and the PAC clones were provided by Dr. Gesk (Institute of Human Genetics, University Hospital Kiel, Germany). At least 200 nuclei were examined. Five tonsil samples from healthy donors were used as negative controls for paraffin-embedded tissues. The cut-off value was calculated as the mean percentage of cells with a false-positive signal constellation plus three standard deviations.

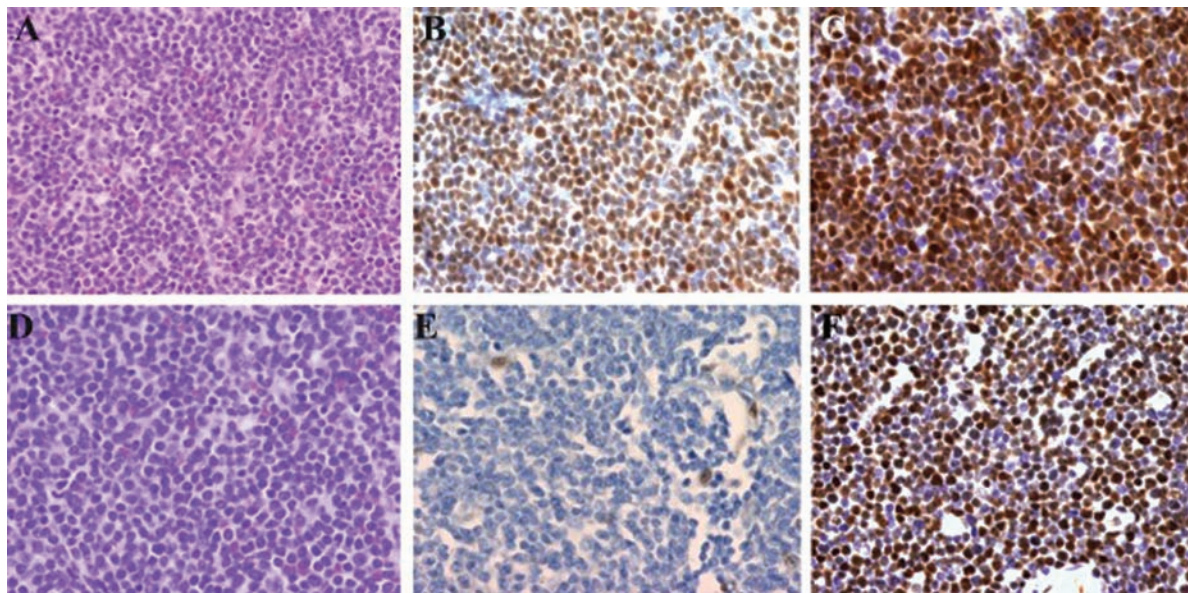


Figure 3. SOX11 protein expression in conventional and cyclin D1-negative MCL. (A, D) Conventional and cyclin D1-negative MCL, respectively (Hematoxylin & Eosin; x400); (B, E) Cyclin D1 and (C, F) SOX11 expression in conventional and cyclin D1-negative MCL, respectively (immunohistochemistry; x200);

Table 2. Clinical features of 12 patients with cyclin D1-negative MCL.

	Age/Sex	B symptoms	Extranodal	LDH	Stage	IPI	Therapy	Response	OS (months)	Status
1	54/F	No	No	Normal	IIIA	1	CHOP	CR*	60	AWD
2	61/M	Yes	PB, BM	High	IV	3	R-CHOP	PR	11	DOD
3	61/M	No	BM	Normal	IV	2	CHOP	PR	88	DOD
4	60/M	Yes	PB, BM, spleen	High	IV	3	COP+FCR	PR	26	DOD
5	54/M	No	BM	Normal	IV	2	CHOP	PR	101	DOD
6	77/M	No	BM,	Normal	IV	3	CTX (KNOSPE)	PR	30	AWD
7	56/M	Yes	BM, Liver	High	IVB	2	CEOP	N/A	25	DOD
8	60/M	N/A	Colorectal tumor	N/A	IIAE		R-CHOP	N/A	39	AWD
9	52/F	No	BM	Normal	IVA		R-CHOP	PR	37	AWD
10	70/F	Yes	Tonsil	Normal	IIIE		R-CHOP	PR	37	DOD
11	39/M	Yes	PB, BM	High	IV	2	R-CHVmP/BO	PR	24	DOD
12	68/M	No	No	Normal	IA	1	R-CHOP+RDT	CR*	71	DOD

LDH: lactate dehydrogenase; IPI: International Prognostic Index; OS: overall survival; PB: peripheral blood; BM: bone marrow; C: cyclophosphamide; H: adriamycin; O: vincristine; P: prednisone; R: rituximab; E: etoposide; F: fludarabine; Vm: teniposide; B: bleomycin; RDT: radiotherapy; CR: complete remission; PR, partial response; AWD: alive with disease; DOD: died of disease; N/A: not available. * Relapsed (see text).

Statistical analysis

The χ^2 test was used to evaluate the different levels of SOX11 expression. The quantitative RT-PCR results of SOX11, cyclin D1, D2 and D3 expression levels were compared using the Mann-Whitney test. *p* values less than 0.05 were considered statistically significant. Statistical tests were performed using SPSS v14 software (SPSS, Chicago, IL, USA).

Results

SOX11 mRNA expression in B-cell lymphomas

To confirm the specificity of SOX11 mRNA expression in MCL we assembled multiple microarray datasets derived from previous LLMPP studies (Figure 1). Most of the MCL showed higher levels of SOX11 (mean=1122.9; SD=754.6) compared to BL (n=33; mean=122.5; SD=136.3), DLBCL (n=46; mean=26.951; SD=14.4), PMBL (n=20; mean=24.2; SD=2.8) and FL (n=44; mean=26.3; SD=1.8). However, 33% of the cases of BL (11 of 33) showed similar SOX11 expression to that displayed by the MCL with the lower levels (3-22%), indicating that SOX11 overexpression is not completely restricted to MCL.

The mRNA expression of SOX11 was further investigated by quantitative RT-PCR in frozen samples from an additional series of MCL and a range of B-cell lymphomas (Figure 2). SOX11 was highly expressed in eight out of nine MCL (88%) (mean=8.9; SD=9.4). Concordantly with microarray expression data, two of the three cases of BL showed similar mRNA levels to those observed in MCL (mean= 3.5; SD= 4.9) while expression was undetectable or very low in other types of lymphomas (mean= 0.05; SD= 0.1) (Figure 2).

SOX11 protein expression in mantle cell lymphoma and other non-Hodgkin's lymphoma

To confirm the specific detection of SOX11 in MCL we investigated protein expression by immunohistochemistry in a series of 54 cyclin D1-positive MCL, and 209 other lymphoid neoplasms (Table 1). Interestingly, virtually all MCL were strongly positive for SOX11 (50/54, 93%), with a nuclear pattern (Figure 3). The staining was intense and relatively homogeneous in most of the cells. Compared to cyclin D1 staining, SOX11 reactivity was stronger and more homogeneous.

Interestingly, the five T-cell and the B-cell lymphoblastic leukemia/lymphomas showed strong SOX11 nuclear expression. Notably, one case of classic Hodgkin's lymphoma, two of eight BL and two of the three T-cell prolymphocytic leukemias were also positive. The remaining Hodgkin's lymphoma, T and B-cell lymphomas, including two multiple myeloma with t(11;14) and cyclin D1 expression were negative or showed only a cytoplasmic dot-like staining (Table 1, Figure 4).

We also examined the expression of SOX11 in reactive tonsil lymph node and spleen specimens. No nuclear expression was observed in any lymphocyte compartment. Only cytoplasmic staining was seen in cells from reactive germinal centers.

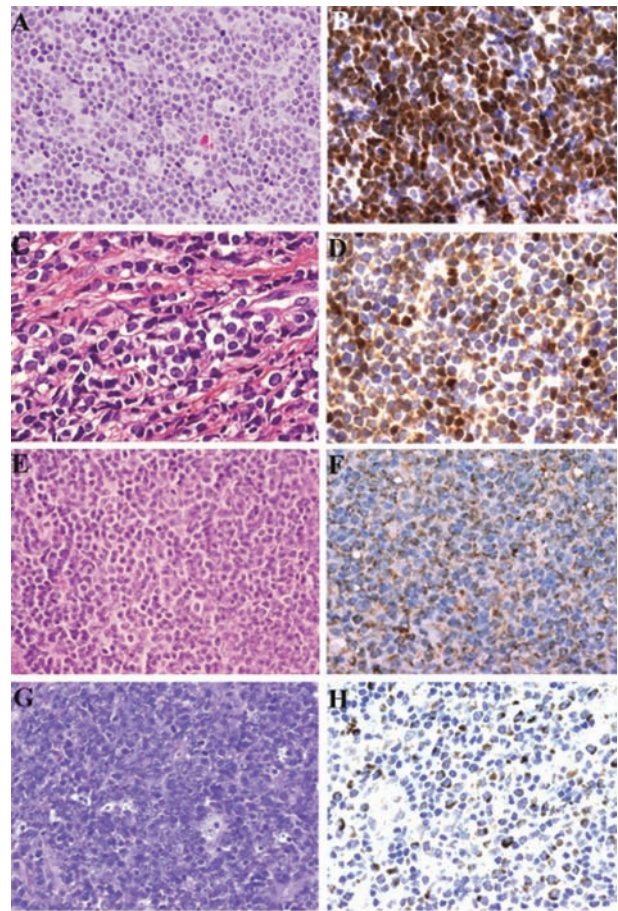


Figure 4. Nuclear SOX11 staining is observed in Burkitt's lymphoma and T-cell prolymphocytic lymphoma but staining is only cytoplasmic in follicular lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma. (A,B) Burkitt's lymphoma; (C,D) T-cell prolymphocytic lymphoma; (E,F) follicular lymphoma; (G,H) diffuse large B-cell lymphoma.

SOX11 expression in cyclin D1-negative mantle cell lymphoma

To determine whether SOX11 expression could be a reliable marker for cyclin D1-negative MCL we analyzed SOX11 expression in 12 cases of cyclin D1-negative MCL. Five of the six initial cases examined by microarrays showed very high levels, similar to the remaining cyclin D1-positive MCL (Figure 1).⁸ SOX11 mRNA expression was then investigated in five additional cases of cyclin D1-negative MCL by quantitative RT-PCR using RNA extracted from formalin-fixed paraffin embedded tissues. The five cases showed high levels (mean=4.28; SD=4.38), similar to those observed in conventional cyclin D1-positive MCL obtained from equivalent tissue (mean=12.9; SD=19.46)(*p*=0.39). SOX11 protein expression was examined by immunohistochemistry in the 12 cyclin D1-negative MCL, and all of them showed strong nuclear positive staining similar to that occurring in conventional cyclin D1-positive MCL (Figure 3).

Clinical and pathological characteristics of cyclin D1-negative mantle cell lymphoma

The clinical characteristics of the 12 patients with cyclin D1-negative MCL are summarized in Table 2. Nine patients were males and the median age of the 12 patients was 60 years (range, 39-70 years). B-symptoms were observed in five patients (46%). Generalized lymphadenopathy was the most common form of presentation and extranodal sites were involved in ten patients (83%), bone marrow being the most common site (67%). Serum levels of lactate dehydrogenase were elevated in four patients (36%). All patients received different chemotherapeutic treatments. Case 1 relapsed with peripheral blood, bone marrow and colorectal involvement 26 months after the initial diagnosis and case 12 relapsed with prostate involvement 12 months after the initial diagnosis. After a median follow-up for surviving patients of 38 months (range, 37-60 months), eight patients had died of progressive lymphoma and four patients were alive with disease.

The median overall survival was 71 months. All cases had a diffuse growth pattern, 11 with classical and one with pleomorphic cytology. All tumors expressed mature B-cell markers and CD5. Cyclin D1 was nega-

tive in the tumor cells but staining was detected in occasional endothelial cells or histiocytes. The absence of the t(11;14) translocation was confirmed by FISH analysis in all cases (Figure 5).

We studied mRNA levels of cyclin D1, D2 and D3 in five of the six new cases. We confirmed absence or virtually negative levels of cyclin D1 by quantitative RT-PCR. Notably, high mRNA levels of cyclin D2 (3 cases) or cyclin D3 (1 case) were found in four of the five cases studied, whereas the remaining case showed similar cyclin D2 levels as the cyclin D1-positive tumors.

To determine the potential use of cyclin D2 or D3 protein expression to identify cyclin D1-negative MCL we stained the 12 cyclin D1-negative MCL, 4 conventional MCL and 21 other B-cell lymphomas. Most of the tumors showed nuclear positivity for both cyclins

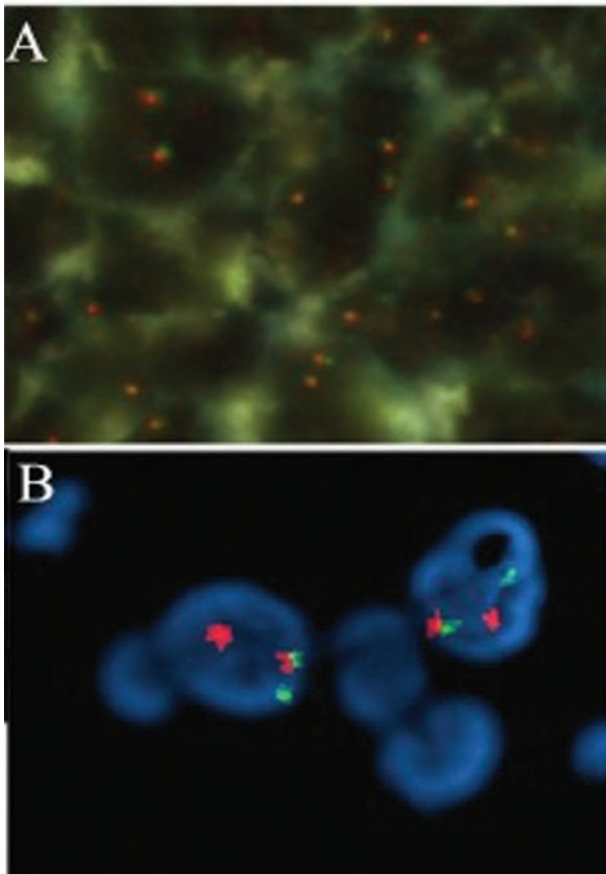


Figure 5. FISH analysis on cyclin D1-negative MCL. (A) *CCND1* break-apart probe showing two fusion signals in each cell; (B) *CCND2* probe showing a split signal pattern suggesting a rearrangement of the gene.

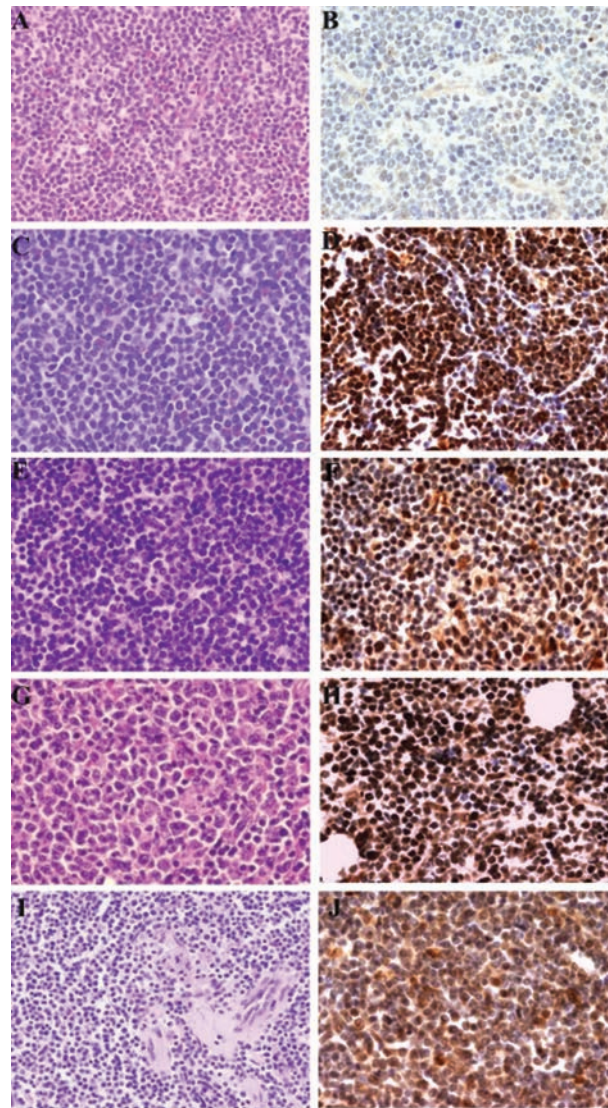


Figure 6. Cyclin D2 protein expression in conventional and cyclin D1-negative MCL and in various lymphoid neoplasms. (A,B) conventional MCL; (C,D) cyclin D1-negative MCL; (E,F) small lymphocytic lymphoma; (G,H) follicular lymphoma; (I,J) splenic marginal zone lymphoma.

or predominantly one of them without clear differences between the cyclin D1-positive or negative MCL and other B-cell lymphomas (Figure 6). We investigated the possible presence of *CCND2* or *CCND3* translocations in the six new cyclin D1-negative tumors by FISH. Only one case (case 10) showed a split signal pattern of *CCND2* in 21% of the cells, suggesting a rearrangement of this gene (Figure 5).

Discussion

Cyclin D1-negative MCL were initially identified by expression profiling studies as small B-cell neoplasms with the morphological, immunophenotypic, and gene expression features of conventional MCL but lacking both cyclin D1 expression and the 11q13 translocation and expressing high levels of cyclin D2 or D3.^{9,20} Subsequent genetic studies demonstrated that cyclin D1-negative MCL may carry chromosomal translocations fusing these two other cyclins to the heavy or light chains of the immunoglobulin genes and that they also exhibit the same secondary genetic aberrations as conventional MCL.^{10,12-14} These observations indicated that cyclin D1-negative and positive MCL share similar genetic features suggesting that they are part of the same biological entity. The number of cases reported is still limited and the clinical characteristics of the patients are not well defined.¹² We have now expanded these observations including five new cases and updating the follow-up of the previously reported patients. We found that most of the 12 cyclin D1-negative cases of MCL occurred in elderly males; typically the patients presented in advanced stage with frequent peripheral blood and extranodal involvement. The clinical behavior was also aggressive with poor response to therapy and an overall survival rate not substantially different from that in patients with cyclin D1-positive MCL.

The aggressive clinical evolution of these lymphomas highlights the need for reliable markers to identify such malignancies and to distinguish them from other small B-cell lymphomas because a different therapeutic management is advocated. Indeed, Yatabe *et al.* observed a significantly better outcome in patients with small B-cell lymphomas resembling MCL than in patients with true MCL.⁸

The differential diagnosis between cyclin D1-negative MCL and other small B-cell lymphomas may be difficult. Morphologically the irregular nuclei characteristic of MCL may be observed in some cases of chronic lymphocytic leukemia (CLL)²¹ or marginal zone lymphoma (MZL).²² CD23 is expressed in CLL but also in occasional cases of MCL.²³ On the other hand, CD5 and CD43 expression, a common feature of MCL and CLL may also occur in MZL.²⁴ Finally, although CD10 or BCL-6 have not been detected in cyclin D1-negative MCL some conventional MCL may express these germinal center markers.^{25,26} On this background, new and reliable biomarkers are of paramount importance.

In this study, we investigated the potential value of

SOX11 expression as a marker for cyclin D1-negative MCL. Two recent studies^{16,17} reported overexpression of this transcription factor as highly specific to MCL because it was detected in around 90% of the MCL examined but in none of the CLL or FL and only weakly in two of 30 DLBCL. To confirm these findings and expand the number of lymphoid neoplasms investigated we first reviewed the expression profile database of the cases examined in the LLMPP consortium. SOX11 was highly expressed in virtually all conventional MCL (98%) but the levels were undetectable in all FL, DLBCL, and PMBL examined. Interestingly, moderate levels of expression were observed in 33% of the BL. We further confirmed these observations by quantitative RT-PCR and immunohistochemistry in additional MCL cases and other lymphoid neoplasms. Thus, nuclear expression of the SOX11 protein was detected in 93% of all MCL examined but in none of the large series of CLL, FL, nodal and splenic MZL, DLBCL T-cell lymphomas and in only one classical Hodgkin's lymphoma. In concordance with the gene expression array studies, we detected variable SOX11 expression in BL. In addition, two of the three T-PLL and all LBL were also positive. However, these tumors are not usually mistaken for MCL.

Like Ek *et al.*¹⁶ we observed immunohistochemical reactivity with a dot-like pattern in the cytoplasm of lymphoid cells in reactive germinal centers and in some lymphomas but notably this pattern was not observed in MCL. The significance of this pattern is not clear but most probably does not correspond to the presence of SOX11 since it was only detected in non-MCL and reactive tissues that do not have detectable *SOX11* mRNA by microarray gene expression profiling or quantitative RT-PCR. Altogether, these findings confirm that high *SOX11* mRNA levels and detection of the nuclear protein are reliable markers of MCL.

These results prompted us to investigate SOX11 expression in our cyclin D1-negative MCL. Interestingly, all of them showed strong SOX11 nuclear protein expression indicating that this may indeed be a useful marker to identify these tumors. Ek *et al.*¹⁶ included a case of apparently cyclin D1-negative MCL in their series. However, this case had a t(11;14) translocation and, therefore, the lack of detection of cyclin D1 was most probably the consequence of a technical problem. This observation suggests that SOX11 may also be a reliable marker for diagnosing conventional MCL when cyclin D1 detection fails for technical reasons.

Gene expression array studies showed that cyclin D1-negative MCL overexpressed cyclin D2 or D3, and some cases carried chromosomal translocations of these genes.^{9,12,13,20} We confirmed the high levels of these two cyclins in the newly studied cyclin D1-negative MCL cases and in one case we demonstrated a cyclin D2 rearrangement by FISH. Cyclin D2 and D3 were detected immunohistochemically in the cyclin D1-negative tumors but also in most non-MCL without marked differences in the intensity of the staining,

probably due to the lower discriminatory power of this technique which would, therefore, be of limited value in the differential diagnosis of these tumors.

In conclusion, we have confirmed the high specificity of *SOX11* mRNA and nuclear protein expression as markers of MCL. The detection of this transcription factor is a useful biomarker for identifying true cyclin D1-negative MCL. Although *SOX11* can also be detected in some BL, LBL and T-PLL, the different morphological and phenotypic features of these malignancies allow easy recognition of the cases of cyclin D1-negative MCL.

Authorship and Disclosures

AM and CR performed research, collected, analyzed and interpreted data and drafted the manuscript, contributed equally to it; EH, DJ, DW, JD, S-SC, ESJ, CR-M, KF, AR, DC and AL-G collected and interpreted data. CB, AV, FS, SD, LR, RB, RDG and LMS performed research and interpreted data; GO, PJ and EC designed research, analyzed and interpreted data, drafted the manuscript and are co-senior authors.

The authors reported no potential conflicts of interest.

References

- Salaverria I, Perez-Galan P, Colomer D, Campo E. Mantle cell lymphoma: from pathology and molecular pathogenesis to new therapeutic perspectives. *Haematologica* 2006;91:11-6.
- Jares P, Colomer D, Campo E. Genetic and molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: perspectives for new targeted therapeutics. *Nat Rev Cancer* 2007;7:750-62.
- Beà S, Ribas M, Hernández JM, Bosch F, Pinyol M, Hernández 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.
- Katzenberger T, Kienle D, Stilgenbauer S, Höller S, Schilling C, Mäder U, et al. Delineation of distinct tumour profiles in mantle cell lymphoma by detailed cytogenetic, interphase genetic and morphological analysis. *Br J Haematol* 2008;142:538-50.
- Mestre-Escorihuela C, Rubio-Moscardo F, Richter JA, Siebert R, Climent J, Fresquet V, et al. Homozygous deletions localize novel tumor suppressor genes in B-cell lymphomas. *Blood* 2007;109:271-80.
- Salaverria I, Espinet B, Carrió A, Costa D, Astier L, Slotta-Huspenina J, et al. Multiple recurrent chromosomal breakpoints in mantle cell lymphoma revealed by a combination of molecular cytogenetic techniques. *Genes Chromosomes Cancer* 2008;47:1086-97.
- Sander S, Bullinger L, Leupolt E, Benner A, Kienle D, Katzenberger T, et al. Genomic aberrations in mantle cell lymphoma detected by interphase fluorescence in situ hybridization. Incidence and clinicopathological correlations. *Haematologica* 2008;93:680-7.
- Yatabe Y, Suzuki R, Tobinai K, Matsuno Y, Ichinohasama R, Okamoto M, et al. Significance of cyclin D1 overexpression for the diagnosis of mantle cell lymphoma: a clinicopathologic comparison of cyclin D1-positive MCL and cyclin D1-negative MCL-like B-cell lymphoma. *Blood* 2000;95:2253-61.
- Fu K, Weisenburger DD, Greiner TC, Dave S, Wright G, Rosenwald A, et al. Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study based on gene expression profiling. *Blood* 2005;106:4315-21.
- Salaverria I, Zettl A, Beà S, Moreno V, Valls J, Hartmann E, et al. Specific secondary genetic alterations in mantle cell lymphoma provide prognostic information independent of the gene expression-based proliferation signature. *J Clin Oncol* 2007;25:1216-22.
- Bea S, Campo E. Secondary genomic alterations in non-Hodgkin's lymphomas: tumor-specific profiles with impact on clinical behavior. *Haematologica* 2008;93:641-5.
- Wlodarska I, Dierickx D, Vanhentenrijk V, Van Roosbroeck K, Pospisilová H, Minnei F, et al. Translocations targeting *CCND2*, *CCND3*, and *MYCN* do occur in t(11;14)-negative mantle cell lymphomas. *Blood* 2008;111:5683-90.
- Gesk S, Klapper W, Martín-Subero JI, Nagel I, Harder L, Fu K, et al. A chromosomal translocation in cyclin D1-negative/cyclin D2-positive mantle cell lymphoma fuses the *CCND2* gene to the *IGK* locus. *Blood* 2006;108:1109-10.
- Herens C, Lambert F, Quintanilla-Martinez L, Bisig B, Deusings C, de Leval L. Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma with cryptic t(12;14)(p13;q32) and cyclin D2 overexpression. *Blood* 2008;111:1745-6.
- Rizzatti EG, Falcão RP, Panepucci RA, Proto-Siqueira R, Anselmo-Lima WT, Okamoto OK, et al. Gene expression profiling of mantle cell lymphoma cells reveals aberrant expression of genes from the PI3K-AKT, WNT and TGFβ signalling pathways. *Br J Haematol* 2005;130:516-26.
- Ek S, Dictor M, Jerkeman M, Jirstrom K, Borrebaek CA. Nuclear expression of the non B-cell lineage *Sox11* transcription factor identifies mantle cell lymphoma. *Blood* 2008;111:800-5.
- Wang X, Asplund AC, Porwit A, Flygare J, Smith CI, Christensson B, et al. The subcellular *Sox11* distribution pattern identifies subsets of mantle cell lymphoma: correlation to overall survival. *Br J Haematol* 2008;143:248-52.
- Chuang SS, Huang WT, Hsieh PP, Tseng HH, Campo E, Colomer D, et al. Mantle cell lymphoma in Taiwan: clinicopathological and molecular study of 21 cases including one cyclin D1-negative tumor expressing cyclin D2. *Pathol Int* 2006;56:440-8.
- Sonoki T, Harder L, Horsman DE, Karran L, Taniguchi I, Willis TG, et al. Cyclin D3 is a target gene of t(6;14)(p21.1;q32.3) of mature B-cell malignancies. *Blood* 2001;98:2837-44.
- Rosenwald A, Wright G, Wiestner A, Chan WC, Connors JM, Campo E, et al. The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma. *Cancer Cell* 2003;3:185-97.
- De Oliveira MS, Jaffe ES, Catovsky D. Leukaemic phase of mantle zone (intermediate) lymphoma: its characterisation in 11 cases. *J Clin Pathol* 1989;42:962-72.
- Isaacson PG, Wotherspoon AC, Diss T, Pan LX. Follicular colonization in B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *Am J Surg Pathol* 1991;15:819-28.
- Schlette E, Fu K, Medeiros LJ. CD23 expression in mantle cell lymphoma: clinicopathologic features of 18 cases. *Am J Clin Pathol* 2003;120:760-6.
- 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* 1999;23:59-68.
- Camacho FI, García JF, Cigudosa JC, Mollejo M, Algara P, Ruiz-Ballesteros E, et al. Aberrant *Bcl6* protein expression in mantle cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* 2004;28:1051-6.
- Zanetto U, Dong H, Huang Y, Zhang K, Narbaitz M, Sapia S, et al. Mantle cell lymphoma with aberrant expression of CD10. *Histopathology* 2008;53:20-9.

TRABAJO N°2

**El reordenamiento de *CCND2* es el evento genético más frecuente en el
linfoma de células del manto ciclina D1 negativo**

(Blood, aceptado en Septiembre del 2012)

RESUMEN

El reordenamiento de *CCND2* es el evento genético más frecuente en el linfoma de células del manto ciclina D1 negativo

El linfoma de células del manto (MCL) ciclina D1 negativo no está bien caracterizado debido, en parte, a las dificultades en su reconocimiento. *SOX11* se ha identificado recientemente como un biomarcador fiable de MCL, que también se expresa en la variante ciclina D1 negativo. Hemos investigado 40 linfomas con morfología e inmunofenotipo de MCL, negativos para la expresión de ciclina D1/t(11;14)(q13;q32) pero con expresión de *SOX11*. Estos tumores se presentaban clínicamente con linfadenopatías generalizadas, edad avanzada, y supervivencia corta (supervivencia del 48% a los 5 años). En el 55% de los casos se detectaron reordenamientos, en 18/22 casos con el gen *IG* como pareja, concretamente con cadenas ligeras (10 *IGK@*, 5 *IGL@*). No se encontraron mutaciones en los dominios de fosforilación de *CCND1*, *CCND2* y *CCND3*. El perfil genómico global de los 32 MCL ciclina D1 negativo-*SOX11* positivo analizados mediante *arrays* de DNA, fue similar al de los MCL convencionales ciclina D1/*SOX11* positivos. Las deleciones en 17p y la elevada expresión de Ki67 confieren una supervivencia más baja a estos pacientes. Esta caracterización exhaustiva de una serie larga de MCL ciclina D1 negativo indica que estos tumores son clínica y biológicamente similares a los MCL convencionales ciclina D1 positivos, y proporciona una base para la identificar y tratar adecuadamente a estos pacientes.

CCND2 rearrangements are the most frequent genetic events in Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma

Short title: Cyclin D1-negative MCL

Itziar Salaverria,^{1,2*} Cristina Royo,^{1*} Alejandra Carvajal-Cuenca,¹ Guillem Clot,¹ Alba Navarro,¹ Alejandra Valera,¹ Joo Y Song,³ Renata Woroniecka,⁴ Grzegorz Rymkiewicz,⁵ Wolfram Klapper,⁶ Elena M Hartmann,⁷ Pierre Sujobert,⁸ Iwona Wlodarska,⁹ Judith A Ferry,¹⁰ Philippe Gaulard,⁸ German Ott,¹¹ Andreas Rosenwald,⁷ Armando Lopez-Guillermo,¹² Leticia Quintanilla-Martinez,¹³ Nancy L Harris,¹⁰ Elaine S Jaffe,³ Reiner Siebert,² Elias Campo,¹ Sílvia Beà¹

¹Department of Pathology, Hematopathology Unit, Hospital Clínic, IDIBAPS, University of Barcelona, Barcelona, Spain; ²Institute of Human Genetics, University Hospital Schleswig-Holstein Campus Kiel/Christian-Albrechts University, Kiel, Germany; ³Laboratory of Pathology, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD; ⁴Cytogenetic Laboratory, ⁵Department of Pathology, The Maria Skłodowska-Curie Memorial Institute and Oncology Centre, Warsaw, Poland; ⁶Department of Pathology, Hematopathology Section and Lymph Node Registry, Christian Albrechts University, Kiel, Germany; ⁷Institute of Pathology, University of Würzburg, Germany; ⁸Henri Mondor Hospital, Creteil, France; ⁹Center for Human Genetics, KU Leuven, Leuven, Belgium; ¹⁰Department of Pathology, Massachusetts General Hospital, Boston, MA; ¹¹Department of Clinical Pathology, Robert-Bosch-Krankenhaus, and Dr. Margarete Fischer-Bosch Institute of Clinical Pharmacology, Stuttgart, Germany; ¹²Department of Hematology, Hematopathology Unit, Hospital Clínic, Barcelona, Spain; ¹³Institute of Pathology, Eberhard-Karls-University of Tübingen, Tübingen, Germany.

*These two authors contributed equally to the study

Corresponding author: Sílvia Beà, Centre Esther Koplowitz, 2nd floor,
Rosselló, 153, 08036-Barcelona (Spain); Tel.: +34-93-2275400; ext. 4582; Fax:
+34-93-2275717; sbea@clinic.cat

Abstract word count: 197

Text word count: 3393

Number of Figures/Tables: 4 Figures and 3 Tables

Number of References: 33

ABSTRACT

Cyclin D1-negative mantle cell lymphomas (MCL) are not well characterized, in part due to the difficulties in their recognition. SOX11 has been recently identified as a reliable biomarker of MCL, also expressed in the cyclin D1-negative variant. We investigated 40 lymphomas with MCL morphology and immunophenotype, negative for cyclin D1 expression/t(11;14)(q13;q32) but SOX11-positive. These tumors presented clinically with generalized lymphadenopathy, advanced stage, and had a poor outcome (5-year overall survival 48%). Chromosomal rearrangements of the *CCND2* locus were detected in 55% of the cases, with an *IG* gene as partner in 18/22 cases, in particular with light chains (10 *IGK*@, 5 *IGL*@). No mutations in the phosphorylation motifs of *CCND1*, *CCND2* and *CCND3* were detected. The global genomic profile and the high complexity of the 32 cyclin D1-negative SOX11-positive MCL analyzed by copy number arrays were similar to the conventional cyclin D1/SOX11-positive MCL. 17p deletions and high Ki67 expression conferred a significantly worse outcome to the patients. This comprehensive characterization of a large series of cyclin D1-negative MCL indicates that these tumors are clinically and biologically similar to the conventional cyclin D1-positive MCL and provides a basis for the proper identification and clinical management of these patients.

Key words: mantle cell lymphoma, cyclin D1-negative, *CCND2* translocation, *SOX11* expression, genomic profiling.

INTRODUCTION

Mantle cell lymphoma (MCL) is genetically characterized by the t(11;14)(q13;q32) translocation that leads to the juxtaposition of the *CCND1* gene to the immunoglobulin heavy chain (*IGH@*) gene, resulting in cyclin D1 overexpression.^{1,2} In recent years there has been an ongoing debate after pathologists and geneticists identified a small subset of lymphomas resembling conventional MCL both morphologically and phenotypically, but with absence of the t(11;14)/*CCND1* breakpoint and cyclin D1 expression. This observation prompted discussion regarding whether “true” MCL negative for cyclin D1 exists. A gene expression study shed light on this controversy reporting that six recognized cyclin D1-negative lymphomas with morphologic, pathologic, clinical and molecular features similar to typical MCL also had a similar global gene expression profile (GEP).³ In the absence of cyclin D1, these cases overexpressed cyclin D2 or D3 but without evidence of chromosomal aberrations involving these loci. Subsequent studies have identified isolated cyclin D1-negative MCL harboring a t(2;12)(p12;p13) fusing the *CCND2* gene to the *IGK@* locus,⁴ t(12;22)(p13;q22) with *IGL-CCND2* fusion,⁵ cryptic t(12;14)(p13;q32)/*IGH-CCND2*⁶ or *CCND2* breaks with unidentified partner.⁷ Additionally, a translocation of the *CCND3* gene has been detected in a single MCL case,⁸ although more frequently in other mature B-cell malignancies.⁹ Nevertheless, these reports corresponded to isolated cases and the real incidence of *CCND2* or *CCND3* translocations has not been well studied in this MCL variant.

Since they are rare, not easy to recognize and reliable criteria for their diagnosis are lacking, cyclin D1-negative MCL are not well characterized. Initial studies

suggested that these tumors may be biologically and clinically similar to cyclin D1-positive MCL, however, the number of cases investigated is small.^{3,10} In current trials of MCL, cyclin D1-negative cases are not included. Given the increasing number of new therapeutic protocols developed for MCL and the improved survival of these patients,¹¹ it is important to clarify whether cyclin D1-negative MCL is a variant of the same disease, since these patients could benefit from the advances in the management of MCL.

The use of the immunohistochemical detection of cyclin D2 or cyclin D3 in routine diagnosis is not helpful to recognize these tumors because these cyclins are also expressed in other small B-cell lymphomas.^{12,13} The identification of the SOX11 transcription factor as a reliable and highly specific biomarker for conventional cyclin D1-positive MCL, which in addition is not expressed in other low grade B-cell lymphomas, offers a valuable practical tool to properly recognize cases of cyclin D1-negative MCL.^{12,14-19}

We report herein a complete characterization of 40 cyclin D1-negative MCL investigated for SOX11 expression and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for *CCND2* and *CCND3* translocations. Additionally, mutational analysis of the cyclin D genes and high resolution copy number (CN) profiling were performed.

MATERIAL AND METHODS

Lymphoma samples and clinical data

The inclusion criteria were lymphomas with MCL morphology, MCL phenotype consistent with the disease, SOX11 expression and negativity for cyclin D1 expression and/or t(11;14). A total of 41 cases were recruited, but one case (ID45) with morphology and phenotype consistent with MCL but negative for

SOX11 was excluded from further studies. Twenty-three cases were previously published in part (cases 1-23).^{3,4,6-8,12} The morphology, growth pattern, and cyclin D1, cyclin D2, cyclin D3, cyclin E1, SOX11, p27, Ki67, CD5, CD23 and CD10 protein expression were evaluated in formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue sections by immunohistochemistry (IHC) as previously described.¹² Flow cytometry was performed in case ID36 with leukemic involvement and no tissue available. Morphological and clinical data of all patients included in the study are summarized in Tables 1-3 and supplemental Table S1. This study was approved by the Institutional Review Board of the participating institutions, where required.

FISH analyses

Interphase FISH analysis was performed on FFPE sections, frozen tissue sections or cells left over from prior cytogenetic analyses. Complete methods and probes used for the detection of breakpoints or gene fusions affecting the *CCND1*, *CCND2*, *CCND3*, *IGH@*, *IGL@*, and *IGK@* loci, are described in supplemental Material and supplemental Table S2.

DNA extraction and array-comparative genomic hybridization (aCGH)

Material from 27 samples was obtained for DNA extraction. DNA of 21 samples was extracted from FFPE tissue blocks using the phenol-chloroform extraction method according to previously published protocols with minor modifications.²⁰ Additionally, DNA of six cases was extracted from frozen tissue (3 cases), cells in fixative (2 cases) and DMSO cryopreserved cells (1 case) using standard protocols. Tumor cell content was >70% in all samples. Details on DNA

extraction and aCGH methods are described in the supplemental Methods. SurePrint G3 Human aCGH Microarray 1M (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) hybridization was outsourced to qGenomics (www.qgenomics.com). Detection of CN alterations (CNA) was performed using the Aberration Detection Method-2 (ADM-2) by Agilent Inc. algorithm and Nexus 6.0 Discovery Edition (Biodiscovery, El Segundo, CA). A noise-reduction method "waves aCGH correction algorithm" (WACA) based on GC content and fragment size adjustment was applied.²¹ Previously published CN data (CGH and Affymetrix SNP-500K array) of six cyclin D1-negative MCL were included.^{22,23} Data from 92 previously reported cyclin D1-positive/SOX11-positive MCL analyzed using SNP-100K and 500K arrays were used for the comparison of genetic profiles.^{23,24}

Molecular analyses

In cases ID17 and ID36, in which no tissue for IHC analysis of SOX11 was available, quantitative PCR (qPCR) of SOX11 expression was performed. In cases with available RNA, we analyzed cyclin D1, cyclin D2, cyclin D3 and cyclin E1 expression by qPCR. Detailed procedures are specified in supplemental Methods.

Mutational analysis of *TP53* gene (exons 4-10) in cases with 17p alterations was performed as previously described.²⁵ Mutations altering the phosphorylation motif of *CCND1*, *CCND2* and *CCND3* genes were investigated in cases without cyclin D gene rearrangements. The primers used are described in the supplemental Table S3. Sanger sequencing was performed on amplified

products for *TP53* and cyclin D genes using an ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, Santa Clara, CA).

Statistical analyses

Chi square test was used to compare morphological and clinical characteristics between cyclin D1-negative and positive MCL patients. A probe-wise comparison of CNA in cyclin D1-negative and positive MCL using Fisher's exact test was performed. Overall survival (OS) was defined as the time from MCL diagnosis to the date of the last follow-up or death as a result of any cause. Survival was estimated with the Kaplan-Meier method and survival curves were compared using the log-rank test. The Cox proportional hazards model was used to analyze prognostic factors. *P*-values less than .05 were considered statistically significant.

RESULTS

Histopathology and immunohistochemistry

The pathological features of 40 cases are summarized in Tables 1 and Table Supplementary S1. IHC analysis revealed strong positivity of SOX11 in 38 cases (Figure 1A-C'), and in two additional cases with only blood cells available high SOX11 expression was demonstrated by qPCR. The morphology was classical in 38 cases, blastoid in one, and one case progressed from classical morphology to pleomorphic four years after diagnosis. All cases had a diffuse/nodular growth pattern except one case with a restricted mantle zone pattern (Figure 1D-F). Neoplastic cells were monomorphic small to medium-sized with hyperchromatic indented nuclei. All cases were positive for CD20 and

negative for cyclin D1. CD5 was positive in 39/40 (98%) cases, whereas CD10 was negative in 26/27 (96%) cases analyzed and positive in a subset of cells in one case. CD23 was negative in 34/35 (97%) cases, the only positive case showed weak staining. p27 was negative or showed a weaker expression than the associated T-cells in 29/31 (93%) cases. Nine of 24 (38%) cases had a high ($\geq 35\%$) Ki67-proliferative index (Figure 1, Table 1 and supplemental Table S1). Six of seven and six of eight evaluated cases showed nuclear positivity for cyclin D2 or cyclin D3, respectively, but the staining was similar to that observed in other B-cell lymphomas (supplemental Table 4).¹²

FISH-screening for *CCND2* and *CCND3* translocations, mRNA expression and gene mutations

FISH information was gathered from contributors in 19 cases^{3,4,6-8,12} and 22 new patients were studied for *CCND2* and *CCND3* translocations (including four previously published cases without FISH information). By a first FISH-screening using break apart probes, *CCND2* breakpoints were recognized in 22 cases of the 40 cases (55%) (Table 2): ten cases with *IGK-CCND2*, five with *IGL-CCND2* and three with *IGH-CCND2* (Figure 2A-C). In the four additional cases the partner of *CCND2* remained undisclosed. Noteworthy, in two of these four cases the three immunoglobulin genes were excluded as possible partners; in a third case *IGL* @ probe failed repeatedly and in the remaining case no additional material was available for further studies. In 18 cases (45%) in which no *CCND2* breaks were identified, *CCND3* break apart FISH test was performed. No *CCND3* translocations were detected in any case. Complete FISH results are detailed in supplemental Table S5.

The levels of cyclin D1, D2, D3 and E1 expression were evaluated using qPCR in cyclin D1-negative MCL with and without *CCND2* rearrangements. In addition, for comparison, conventional cyclin D1-positive MCL and other B-cell neoplasms (diffuse large B-cell lymphoma [DLBCL], nodal marginal zone lymphoma, follicular lymphoma, chronic lymphocytic leukemia [CLL], Burkitt lymphoma) were analyzed. We observed that *CCND2* translocated MCL (n=8) had high expression levels of cyclin D2 mRNA (mean 160 relative units [RU]), compared to the other groups (mean 14.7 RU, $P=.003$) (supplemental Figure S1A). Additionally, cyclin D3 and cyclin E1 mRNA levels were low in all samples analyzed (supplemental Figure S1B). *CCND1*, *CCND2* and *CCND3* mutational analysis performed in cases without rearrangements of these genes showed no mutations of the phosphorylation site of these genes (supplemental Table 6).

Genomic profiles of cyclin D1-negative MCL

The genomic profile of 32 cyclin D1-negative/SOX11-positive MCLs (17 *CCND2* translocated and 15 *CCND2* non-translocated cases) was analyzed with high-resolution aCGH and SNP-array (Figure 2D, E and Figure 3). CNA were observed in all 32 cases, with a total of 225 losses, 102 gains, nine homozygous deletions and six high-level amplifications (supplemental Table S7). Both the global profile and the number of alterations per case were similar to the previously reported cyclin D1-positive/SOX11-positive MCL cases.^{2,22-24,26} Frequent gains were found at 3q26-q29 (47%), 8q24 (25%) and 18q21-q23 (31%). The only recurrent minimal region of amplification was 3p21.31-p22.3 (one case with and one without *CCND2* translocation). Frequent losses were located at 1p22-p31 (22%), 1p13-p22 (22%), 6q21 (31%), 6q22 (28%), 9p21

(47%), 11q22-q23 (34%), 13q33-q34 (56%), 13q14-q21 (47%) and 17p13 (22%). Recurrent homozygous deletions were detected at 9p21.3 involving *CDKN2A* (seven cases), whereas biallelic losses in single cases were found at 13q14.3 and 17p13.1 (partially involving *TP53* gene).

Cyclin D1-negative MCL with and without *CCND2* rearrangements had similar CN profiles (Figure 2D-E and supplemental Table S8) with median number of CNA similar among both groups (10 vs. 12 CNA/case, respectively). Additionally, no significant differences in terms of CNA were detected between *CCND2* translocation-positive cases with *IGK@* (n=7) and *IGL* (n=4) genes as partners (supplemental Figure S2).

Similar to cyclin D1-positive MCL, a high proportion (15/32, 47%) of cyclin D1-negative/SOX11-positive MCL had 9p21 deletions of different sizes and half of them were homozygous. All 9p21 deletions spanned the *CDKN2A*, *CDKN2B* and *MTAP* loci (supplemental Figure S3 and Table S6). The 17p deletions, including *TP53* gene, were observed in 7/32 cases (22%). Case ID35 had a small homozygous deletion (68.2 kb) affecting the promoter region and exon 1 (detected by aCGH). Mutational analysis of *TP53* gene was performed in four cases with available material. Two cases carried mutations of the remaining allele (ID18 and ID40). In case ID38, exons 7 and 10 were unmutated and no material was available for additional analyses, and ID34 was found unmutated (supplemental Table S6). All 12 cases with 11q alteration involved the target gene *ATM*. Interestingly, *CCND2*-translocated MCL had more frequent 17p deletions than non-translocated cases (35% vs. 7%, $P=.05$) whereas non-translocated MCL had more frequent losses of 11q (60% vs. 18%, $P=.01$). The

frequency of 9p deletions was extremely high and equal in both subgroups (47%) (Figure 4A).

We next compared the profile of CNA with 92 cyclin D1-positive /SOX11-positive MCL of our previously published studies.^{20,22-24} Cyclin D1-negative MCL (n=32) had more frequent deletions of 10q26, 13q32-q34 and 19p13, and gains of 3p24-p22, 4q25-q28, 4q31, 6p25-p22, and 18q21-q23, but low incidence of 1p32-p21 and 9q21-q22 losses (Figure 3A-B and supplemental Table S8).

Clinical features of cyclin D1-negative/SOX11-positive MCL

The clinical characteristics of the patients are summarized in Table 2. There were 29 men and 11 women, with a median age of 63 years (range 33-90 years). Lymphadenopathy (mainly cervical and inguinal) was reported in 38/39 (97%) cases with available information. Extranodal involvement was identified in 36/39 (92%) patients. Two cases had multiple intestinal lymphomatous polyposis, an uncommon but highly characteristic presentation of conventional MCL. High serum levels of lactate dehydrogenase (LDH) and B-symptoms were detected in 8/23 (35%) and 5/19 (26%) patients, respectively.

All but two patients with follow-up information received treatment, including adriamycin-containing chemotherapy in four patients, adriamycin-containing immunochemotherapy in 13, and other treatments in ten. The 5-year OS of the patients was 48% (95% confidence interval [CI], 28-68%) (supplemental Figure S4A). High serum LDH and high expression of Ki67 ($\geq 35\%$) significantly predicted poor OS ($P < .001$ and $P = .03$, respectively) (supplemental Figure S4B-C). Regarding genetic alterations, patients carrying 17p deletions had a significant worse prognosis than cases without this aberration (median survival:

12 vs. 71 months, respectively, $P=.006$) (Figure 4B). Neither the genetic complexity, nor any other loss or gain showed significant impact on OS. In a bivariate analysis including Ki67 expression and 17p deletion, only the latter remained as an independent prognostic parameter for OS ($P=.047$; relative risk 13, 95% CI 1.0-160). Finally, it is of note that the main clinical features and the outcome of the patients were similar for *CCND2*-translocated and non-translocated cases.

DISCUSSION

Mantle cell lymphoma is a well characterized lymphoid neoplasm with the t(11;14) as the primary genetic event leading to overexpression of cyclin D1 and cell cycle deregulation. Several findings have suggested the existence of a particular subset of tumors with the same morphology and phenotype as conventional MCL but lacking cyclin D1 expression and the t(11;14) translocation.³⁻⁸ The transcription factor SOX11 has been demonstrated to be a reliable marker for MCL, in both cyclin D1-positive and -negative cases.^{12,14,18} We report herein the largest series of well-defined cyclin D1-negative MCL with a molecular and genetic comparative study to the conventional cyclin D1-positive MCL. The suitability of adapted high resolution CN arrays and FISH analyses for the examination of FFPE material made it possible to characterize the genomic profile of these tumors at high resolution.

In order to have a well defined series of MCL, only cases with consistent morphology, phenotype and SOX11 positivity entered further analysis. Based on these criteria, only one case with consistent morphology/phenotype was excluded because of a lack of SOX11 expression. This case presented a very

simple CN profile with only one small deletion at 17q12 that was in line with its indolent clinical behavior. The morphology of all cases was indistinguishable from cyclin D1-positive MCL. Only one case in the present series had blastoid morphology at diagnosis (3%), a frequency lower than in most series of conventional cyclin D1-positive MCL. This suggests, that cyclin D1-negative MCL with blastoid or pleomorphic morphology might be underappreciated and probably classified in other categories such as DLBCL.¹⁴ All cases had diffuse/nodular growth pattern except one case with a mantle zone pattern. Almost all cases were positive for CD5 and negative for CD23, CD10 and p27 as expected for MCL.

FISH screening demonstrated that more than half of the cyclin D1-negative MCL carry *CCND2* rearrangements with *IG* genes. Interestingly, in two cases interphase FISH confirmed a clear *CCND2* break with normal *IGH@*, *IGK@* and *IGL@* genes, indicating the probability of a novel translocation partner in addition to the already described translocations. As expected and observed in the literature, high levels of cyclin D2 mRNA were detected only in cases with *CCND2* translocation.⁷ In MCL cases without *CCND2* rearrangement, we cannot exclude *CCND2* breakpoints with far 5' or 3' breaks as well as insertions of *CCND2* into another locus and *vice versa*. However, this seems unlikely because these cases, in contrast to the *CCND2*-translocated cases, have very low levels of cyclin D2, suggesting that other genetic mechanism(s) must be involved in the pathogenesis of these lymphomas. A previous report identifying a *CCND3* translocation in one MCL⁸ could not be substantiated in this large series.

Mutations in the phosphorylation site of cyclin D genes have been observed in Burkitt lymphoma, DLBCL²⁷ and CLL.^{28,29} These mutations eliminate the phosphorylated residue needed for the nuclear export of the cyclins and subsequent degradation by the proteasome. As a consequence, these mutations generate a more stable protein with high levels of expression. No cyclin D mutations were found in the non-rearranged *CCND2* cases, excluding these mutations as an alternative mechanism to cyclin D translocations in these tumors. Further molecular studies will be needed to determine the primary genetic alteration of the MCL cases without cyclin D translocation or mutation, that in the present series represent up to 45% of the cases.

The overall genetic complexity and the genomic profile of the 32 cyclin D1-negative/SOX11-positive cases was similar to those described in cyclin D1-positive MCL.^{2,22-24,26} The frequency of deletions targeting specific loci (e.g. *TP53*, *CDKN2A*, and *ATM* deletions) was similar between both cyclin D1-negative and -positive MCL. However, in the *CCND2*-translocated MCL the high-risk conferring 17p loss was frequently observed, whereas 11q loss was more frequently observed in the cases without *CCND2* translocation.

The proportion of cyclin D1-negative MCL cases with 9p losses was higher in both *CCND2* translocation-positive and -negative subgroups (47%) compared to cyclin D1-positive MCL (7-30% by conventional CGH, 10-36% by array platforms).² Moreover, the pattern of chromosome 9 losses, and specifically 9p in cyclin D1-negative MCL was complex; the repertoire included cases with single *CDKN2A* deletions (focal, larger, or spanning the whole 9p arm), narrow homozygous deletions, monosomy of whole chromosome 9, cases with multiple independent losses in 9p and also cases with independent losses of 9q. The

mechanism triggering 9p21 deletions has been well documented in lymphoblastic leukemias³⁰ where the deletions are formed at a few defined regions by illegitimate activity of the RAG protein complex in V(D)J recombination, whereas the double strand breaks in solid tumors with 9p21 deletions are formed at unspecific regions by microhomology-mediated mechanisms. To determine the exact mechanism operating in MCL a detailed analysis of sequences of the breakpoints would be needed.

Interestingly, two cases had gains of microRNA mir17-92 cluster at 13q31.3. This cluster has been demonstrated experimentally to act as an oncogene in cooperation with *MYC*. Its amplification and overexpression are present in different types of lymphomas including MCL.³¹⁻³³

The existence of cyclin D1-negative MCL was confirmed initially by GEP analysis of cases with the suggested pathologic features. However, this technique is not applicable in clinical practice. On the other hand, the simple detection of SOX11 expression by IHC may help in the identification of these tumors prompting to perform FISH analysis looking for *CCND2* rearrangements or quantify the *CCND2* mRNA levels by RT-PCR, all routine techniques that can be applied in FFPE material.

One important question is whether cases lacking both *CCND1* and *CCND2* translocations represent "true" MCL and not misclassified cases of CD5-positive marginal zone lymphoma or CLL. The differential diagnosis is challenging because these entities may mimic MCL morphologically. However, the strong expression of SOX11 in the tumor cells together with the lack of expression of p27 and CD23 makes this possibility very unlikely. Indeed, the differential diagnosis is important and relevant for patient treatment and prognosis.

Although clinically similar, the cyclin D1-negative MCL cases presented more frequently extranodal involvement than cyclin D1-positive MCL (Table 3). Of note, despite the low number of cases, 17p deletion had an adverse impact on the outcome of these patients.

In summary, to our knowledge this is the largest series to date of this peculiar variant of MCL. From a clinical point of view, the majority of the patients diagnosed as cyclin D1-negative MCL have similar pathological and genetic characteristics in comparison to cyclin D1-positive MCL. In addition, the clinical presentation and evolution is also similar to the cyclin D1-positive patients. These observations suggest that these patients may benefit from the same therapeutic protocols used for the management of patients with conventional MCL. The frequent *CCND2* translocations together with SOX11 expression may be very valuable diagnostic tools to identify these patients. Understanding of the alternative molecular mechanisms involved in the cyclin D2- and cyclin D1 - negative MCL will require further studies.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Miriam Prieto, Reina Zühlke-Jenisch, Magret Ratjen and Manel García-Aragonés for their excellent technical assistance. We also thank Dr. Frédéric Leprêtre and Lluís Armengol for their assistance in the application and adaptation of array-CGH correction algorithm (WACA) to the high resolution aCGH data.

This study was supported by the *Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Fondo de Investigaciones Sanitarias* (PI08/0077; PI11/01177) (S.B.), Alexander von Humboldt Foundation and *Subprograma Juan de la Cierva "Ministerio de Ciencia e Innovación* (JCI-2011-10232) (I.S.), *Instituto de Salud Carlos III, "Beca Predoctoral de Formación en Investigación en Salud"* (FI08/00347) (C.R.) *Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología Española* (CICYT) SAF08/3630 (E.C.), and *Red Temática de Investigación Cooperativa del Cáncer* (RTICC)(RD06/0020/0039) ISCIII (E.C.), Spanish Ministry of Science and Innovation and European Regional Development Fund (ERDF). *Unió Europea "Una manera de fer Europa"*.

AUTHORSHIP

I.S. and C.R. performed molecular analysis, analyzed data and wrote the manuscript; A.N. and A.V. performed molecular analysis; G.C. performed statistical analysis; A.C-C., J.Y.S., R.W., G.R., W.K., E.M.H., P.S., I.W., P.G., J.A.F., G.O., A.R., A.L-G., L.Q-M., N.L.H., E.S.J., and R.S., provided samples, clinical data and performed pathology or molecular review; I.S., E.C. and S.B. conceived the project, analyzed the data, and wrote the manuscript.

DISCLOSURE AND CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Jares P, Colomer D, Campo E. Genetic and molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: perspectives for new targeted therapeutics. *Nat.Rev.Cancer* 2007;7(10):750-762.
2. Royo C, Salaverria I, Hartmann EM et al. The complex landscape of genetic alterations in mantle cell lymphoma. *Semin.Cancer Biol.* 2011;21(5):322-334.
3. Fu K, Weisenburger DD, Greiner TC et al. Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study based on gene expression profiling. *Blood* 2005;106(13):4315-4321.
4. Gesk S, Klapper W, Martin-Subero JI et al. A chromosomal translocation in cyclin D1-negative/cyclin D2-positive mantle cell lymphoma fuses the CCND2 gene to the IGK locus. *Blood* 2006;108(3):1109-1110.
5. Shiller SM, Zieske A, Holmes H, III et al. CD5-positive, cyclinD1-negative mantle cell lymphoma with a translocation involving the CCND2 gene and the IGL locus. *Cancer Genet.* 2011;204(3):162-164.
6. Herens C, Lambert F, Quintanilla-Martinez L et al. Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma with cryptic t(12;14)(p13;q32) and cyclin D2 overexpression. *Blood* 2008;111(3):1745-1746.
7. Quintanilla-Martinez L, Slotta-Huspenina J, Koch I et al. Differential diagnosis of cyclin D2+ mantle cell lymphoma based on fluorescence in situ hybridization and quantitative real-time-PCR. *Haematologica* 2009;94(11):1595-1598.

8. Wlodarska I, Dierickx D, Vanhentenrijk V et al. Translocations targeting CCND2, CCND3, and MYCN do occur in t(11;14)-negative mantle cell lymphomas. *Blood* 2008;111(12):5683-5690.
9. Sonoki T, Harder L, Horsman DE et al. Cyclin D3 is a target gene of t(6;14)(p21.1;q32.3) of mature B-cell malignancies. *Blood* 2001;98(9):2837-2844.
10. Yatabe Y, Suzuki R, Tobinai K et al. Significance of cyclin D1 overexpression for the diagnosis of mantle cell lymphoma: a clinicopathologic comparison of cyclin D1-positive MCL and cyclin D1-negative MCL-like B-cell lymphoma. *Blood* 2000;95(7):2253-2261.
11. Griffiths R, Mikhael J, Gleeson M, Danese M, Dreyling M. Addition of rituximab to chemotherapy alone as first-line therapy improves overall survival in elderly patients with mantle cell lymphoma. *Blood* 2011;118(18):4808-4816.
12. Mozos A, Royo C, Hartmann E et al. SOX11 expression is highly specific for mantle cell lymphoma and identifies the cyclin D1-negative subtype. *Haematologica* 2009;94(11):1555-1562.
13. Metcalf RA, Zhao S, Anderson MW et al. Characterization of D-cyclin proteins in hematolymphoid neoplasms: lack of specificity of cyclin-D2 and D3 expression in lymphoma subtypes. *Mod.Pathol.* 2010;23(3):420-433.
14. Zeng W, Fu K, Quintanilla-Fend L et al. Cyclin D1-negative blastoid mantle cell lymphoma identified by SOX11 expression. *Am.J.Surg.Pathol.* 2012;36(2):214-219.
15. Fernandez V, Salamero O, Espinet B et al. Genomic and gene expression profiling defines indolent forms of mantle cell lymphoma. *Cancer Res.* 2010;70(4):1408-1418.

16. Hsiao SC, Cortada IR, Colomo L et al. SOX11 is useful in differentiating cyclin D1-positive diffuse large B-cell lymphoma from mantle cell lymphoma. *Histopathology* 2012;doi: 10.1111/j.1365-2559.2012.04260.
17. Ek S, Dictor M, Jerkeman M, Jirstrom K, Borrebaeck CA. Nuclear expression of the non B-cell lineage Sox11 transcription factor identifies mantle cell lymphoma. *Blood* 2008;111(2):800-805.
18. Dictor M, Ek S, Sundberg M et al. Strong lymphoid nuclear expression of SOX11 transcription factor defines lymphoblastic neoplasms, mantle cell lymphoma and Burkitt's lymphoma. *Haematologica* 2009;94(11):1563-1568.
19. Carvajal-Cuenca A, Sua LF, Silva NM et al. In situ mantle cell lymphoma: clinical implications of an incidental finding with indolent clinical behavior. *Haematologica* 2012;97(2):270-278.
20. Zettl A, Strobel P, Wagner K et al. Recurrent genetic aberrations in thymoma and thymic carcinoma. *Am.J.Pathol.* 2000;157(1):257-266.
21. Lepretre F, Villenet C, Quief S et al. Waved aCGH: to smooth or not to smooth. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(7):e94.
22. Salaverria I, Zettl A, Bea S et al. Specific secondary genetic alterations in mantle cell lymphoma provide prognostic information independent of the gene expression-based proliferation signature. *J.Clin.Oncol.* 2007;25(10):1216-1222.
23. Hartmann EM, Campo E, Wright G et al. Pathway discovery in mantle cell lymphoma by integrated analysis of high-resolution gene expression and copy number profiling. *Blood* 2010;116(6):953-961.
24. Bea S, Salaverria I, Armengol L et al. Uniparental disomies, homozygous deletions, amplifications, and target genes in mantle cell lymphoma revealed by integrative high-resolution whole-genome profiling. *Blood* 2009;113(13):3059-3069.

25. Royo C, Navarro A, Clot G et al. Non-nodal type of mantle cell lymphoma is a specific biological and clinical subgroup of the disease. *Leukemia* 2012; 26(8):1895-1898.
26. 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(12):4365-4374.
27. Pasqualucci L, Trifonov V, Fabbri G et al. Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nat. Genet.* 2011;43(9):830-837.
28. Puente XS, Pinyol M, Quesada V et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 2011;475(7354):101-105.
29. Schmitz R, Jhavar S, Xiao W et al. Recurrent oncogenic mutations in CCND3 in aggressive lymphomas. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2011;118: Abstract 435.
30. Novara F, Beri S, Bernardo ME et al. Different molecular mechanisms causing 9p21 deletions in acute lymphoblastic leukemia of childhood. *Hum. Genet.* 2009;126(4):511-520.
31. Tagawa H, Seto M. A microRNA cluster as a target of genomic amplification in malignant lymphoma. *Leukemia* 2005;19(11):2013-2016.
32. Navarro A, Bea S, Fernandez V et al. MicroRNA expression, chromosomal alterations, and immunoglobulin variable heavy chain hypermutations in Mantle cell lymphomas. *Cancer Res.* 2009;69(17):7071-7078.
33. Olive V, Jiang I, He L. mir-17-92, a cluster of miRNAs in the midst of the cancer network. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 2010;42(8):1348-1354.

Table 1. Genetic, morphologic and immunophenotypical parameters of 40 cyclin D1-negative/ SOX11-positive MCL.

Parameter	n=40	(%)
CCND2 translocation		
<i>IGH-CCND2</i>	3/40	8
<i>IGK-CCND2</i>	10/40	25
<i>IGL-CCND2</i>	5/40	13
<i>CCND2-break*</i>	2/40	5
<i>CCND2-?†</i>	2/40	5
negative	18/40	45
Growth pattern		
Nodular	16/39	41
Diffuse	19/39	49
Nodular/diffuse	3/39	8
Mantle zone	1/39	3
Morphology		
Classical‡	38/39	97
Blastoid/pleomorphic	1/39	3
Expression		
SOX11 positive	40/40	100
CD5 positive	39/40	98
CD23 negative	34/35	97
CD10 negative	26/27	96
p27 negative /weak T-cells	29/31	93
Cyclin D2	6/7	86
Cyclin D3	6/8	75
Ki67(≥35%)	9/24	38

**CCND2* with unidentified partner.

†*CCND2* with unidentified partner discarding *IGH@*, *IGK@* or *IGL@*.

‡One classical case transformed to pleomorphic.

Table 2. Clinical data of 40 cyclin D1-negative MCL.

ID	Transl	Age/ Gender	LN Involvement	Extranodal	LDH	Stage	IPI	Therapy	Response	OS*
ID1 ^{3,12,22,23}	neg	54/F	LN (inguinal)	No	Normal	IIIA	1	CHOP	CR	60+
ID2 ^{3,12,22,23}	neg	61/M	LN (multiple)	PB, BM	High	IV	3	R-CHOP	PR	11
ID3 ^{3,12,22,23}	neg	61/M	LN	BM	Normal	IV	2	CHOP	PR	88
ID4 ^{3,12,22,23}	neg	60/M	LN (multiple)	PB, BM, Spleen	High	IV	3	COP+FCR	PR	26
ID5 ^{3,12,22,23}	neg	54/M	LN	BM	Normal	IV	2	CHOP	PR	70+
ID6 ^{3,12,22,23}	neg	77/M	LN	BM	Normal	IV	3	C	PR	101
ID7 ¹²	D2-K	56/M	LN (inguinal)	BM, Liver	High	IVB	2	CEOP	-	25
ID8 ¹²	neg	60/M	No	Colorectal†	-	IIAE	-	R-CHOP	PR	67+
ID9 ¹²	neg	52/F	LN	BM	Normal	IVA	-	R-CHOP	CR	84+
ID10 ¹²	D2-K	70/F	LN	Tonsil	Normal	IIIE	-	R-CHOP	PR	37
ID11 ¹²	neg	39/M	LN (multiple)	PB, BM	High	IV	2	R-CHVmp/BO	PR	24
ID12 ¹²	neg	68/M	LN (inguinal)	No	Normal	IA	1	R-CHOP+RT	CR	71
ID13 ^{4,7}	D2-K	70/M	LN (multiple)	BM	-	IVB	-	-	-	-
ID14 ^{6,7}	D2-H	52/M	LN (multiple)	BM, Gastrointestinal tract	-	IV	-	-	-	-
ID15 ⁷	D2-K	82/F	LN (cervical)	Waldeyer ring, Tonsil	-	IIIB	-	-	-	15
ID16 ⁷	D2-?	59/M	LN (multiple)	BM, Spleen	-	IV	-	R-CHOP	CR	118+
ID17 ⁴	D2-K	33/F	LN (cervical)	BM, Duodenum, Colon	-	IVA	-	-	-	-
ID18 ⁸	D2-K	65/M	LN	BM, PB, Tonsil	-	IVB	-	CT and RT	PD	15
ID23 ⁸	neg	42/M	LN	BM, CNS	-	IVB	-	CHOP	CR	37
ID24	D2-H	69/M	LN (cervical)	BM, PB, Waldeyer ring, Tongue	High	IVB	4	HyperCVAD regimen, gemcitabine/oxaliplatin	CR	6+
ID25	neg	60/F	LN (cervical)	-	-	-	-	-	CR	21+
ID26	neg	71/F	LN (inguinal)	BM, Spleen	High	IV	-	R-CHOP	PR	7
ID27	neg	78/M	LN (inguinal)	No	Normal	IIIA	-	None	-	12+
ID28	D2-K	72/M	LN (inguinal)	BM, PB	-	IV	≥3	-	-	-
ID29	D2-break	77/M	LN (cervical)	BM, PB	-	IV	-	R, Bendamustine	NR	-

ID30	neg	54/M	LN (axillary)	BM, PB	Normal	IVA	2	R	PD	2+
ID31	D2-break	77/M	LN (periaortic)	BM	High	IVA	2	R CHOP	CR	22+
ID32	D2-K	73/M	LN (axillary)	BM	-	IV	-	None	-	4
ID33	neg	78/M	LN	Parotid	Normal	IV	2	R-CHOP	CR	38+
ID34	D2-?	60/F	LN	BM, PB	Normal	IV	2	R-CHOP, RDHAP, BMT	CR	22+
ID35	D2-L	56/M	LN (multiple)	BM, PB, Spleen	-	IV	-	FCR	-	12
ID36	D2-L	90/F	LN (mutiple)	BM, Spleen	-	-	-	-	-	15
ID37	D2-L	60/M	LN (mutiple)	BM, Tonsil	Normal	IV	-	FC	CR	39
ID38	neg	51/M	LN (mutiple)	BM, Spleen, Tonsil	Normal	III	-	R-CHOP	-	3+
ID39	D2-L	90/M	LN (cervical)	Tonsil	-	IIA	-	R-COP	PR	14
ID40	D2-K	64/M	LN (multiple)	BM, Spleen, Pleura	High	IV	3-4	R-CHOP	PD	3.5
ID42	D2-L	54/F	LN (inguinal)	Stomach	Normal	IIA	0	R	CR	64+
ID43	D2-H	73/M	LN (mediastinal, subcranial)	Lung	-	low	-	<i>Involved field radiation</i>	-	109+
ID44	D2-K	54/M	LN (inguinal)	BM	Normal	IVA	-	<i>R-CHOP</i>	CR	60+
ID46	neg	56/F	-	Colon mucosa†	-	-	-	-	-	-

B, Bleomycin; BM, Bone Marrow; BMT, BM transplantation; C, cyclophosphamide; CR, complete remission; CT, chemotherapy not specified; D2-?, *CCND2* break with unidentified partner discarding *IGH@*, *IGK@* and *IGL@*; D2-break, *CCND2* break with unidentified partner; E, Etoposide; F, Fludarabine; H, Adriamycin; O, vincristine; P, prednisone; PB, peripheral blood; PD, progressive disease; PEG-IFN, pegylated interferon; PR, partial response; R, Rituximab; RT, radiotherapy; T, treatment; Transl, translocation; Vm, Teniposide; -, not available.

* + indicates alive.

† multiple intestinal lymphomatous polyposis.

Table 3. Comparison of clinical characteristics of Cyclin D1-negative and -positive MCL patients from standard series previously published.²²

	Cyclin D1-negative MCL	Cyclin D1-positive MCL
Patients		
No.	40	71
Median age, y (range)	63 (33-90)	63(38-92)
Sex		
Male	29 (73%)	53 (75%)
Female	11 (27%)	18 (25%)
Histology		
Classic	39† (97%)	58 (82%)
Blastoid*	1 (3%)	13 (18%)
Ann Arbor stage		
I/II	4(11%)	8 (11%)
III/IV	33 (89%)	62 (89%)
B-symptoms	5/19 (26%)	25 (35%)
High LDH	8/23 (35%)	26 (37%)
Extranodal involvement*	37/39 (95%)	53/68 (78%)
BM involvement	28/39 (72%)	39 (56%)
IPI score		
Low Risk (0,1)	3 (19%)	16 (26%)
Intermediate Risk (2,3)	11 (69%)	35 (56%)
High Risk (4,5)	2 (12%)	11 (18%)
Therapy		
Chemotherapy	10 (31%)	57 (83%)
Rituximab or immunochemotherapy*	19 (59%)	9 (13%)
Local therapy/No treatment	3 (10%)	3 (4%)
Response to therapy (CR+PR)	24/27 (88%)	53/66 (80%)
Median survival (months)	38	28

BM: bone marrow; CR: complete response; LDH: lactate dehydrogenase; NR: not reached; PR: partial response.

*Chi square test *P*-value <.05.

†One case progressed from classical morphology to pleomorphic 4 years after diagnosis.

Figure 1. Morphological and immunohistochemical features of cyclin D1-negative MCL. Case ID38 (*CCND2* translocation-negative) and ID44 (*IGK-CCND2* translocation-positive). **(A, A')** Monomorphic small to medium-sized cells with slightly irregular hyperchromatic nuclei (Hematoxylin & Eosin; 400x); **(B, B')** Nuclear positivity for SOX11; **(C, C')** The cellular proliferation marker Ki67 shows positivity in 10-20% of the neoplastic cells (immunohistochemistry; 200x). **(D)** Cyclin D1-negative MCL with mantle zone growth pattern (ID42). Note the expanded mantle zone (Hematoxylin & Eosin; 100x), **(E)** SOX11 is strongly positive and **(F)** Cyclin D1 is not expressed in the neoplastic cells, (immunohistochemistry; 100x).

Figure 2. Genetic features of cyclin D1-negative MCL. **(A)** FISH analysis shows *CCND2* breaks in case ID36. **(B)** FISH image shows an *IGL-CCND2* fusion in case ID36. **(C)** FISH image shows and *IGK-CCND2* fusion in case ID28. Frequency of genetic alterations in *CCND2* **(D)** translocation-positive (n=17) and **(E)** translocation-negative cases (n=15). On the X-axis the chromosomes are represented horizontally from 1 to 22, on the Y-axis the percentage of cases showing the copy number alterations. Gains are represented on the positive Y-axis and colored in blue, whereas losses are represented on the negative Y-axis in red.

Figure 3. Comparison of chromosomal imbalances detected by high-resolution CN array in cyclin D1-negative and cyclin D1-positive MCL. (A) Relative frequency of genomic imbalances in cyclin D1-negative MCL (n=32). (B) Previously reported cyclin D1-positive MCL (n=92). In both panels, the statistically significant gains and losses between both groups are indicated with an asterisk.

Figure 4. Characterization of cyclin D1-negative MCL according to their genetic and molecular features. (A) The genomic complexity is illustrated with bar plots at the top of the panels, reflecting the number of alterations for each case. The plots below indicate the SOX11 expression and the presence of *CCND2* translocations. Orange, SOX11-positive MCL; brown: SOX11-negative MCL; light blue, *CCND2*-translocation positive; dark blue, *CCND2* translocation negative MCL. The status of *CDKN2A*, *ATM*, and *TP53* genes according to array-CGH and SNP-array data is indicated by color (black, not altered; green, loss; blue, homozygous loss; green/orange, loss and mutation; grey, unknown). (B) Kaplan-Meier estimates of overall survival for MCL cyclin D1-negative patients according to 17p status (17p altered vs. 17p not altered). D=dead.

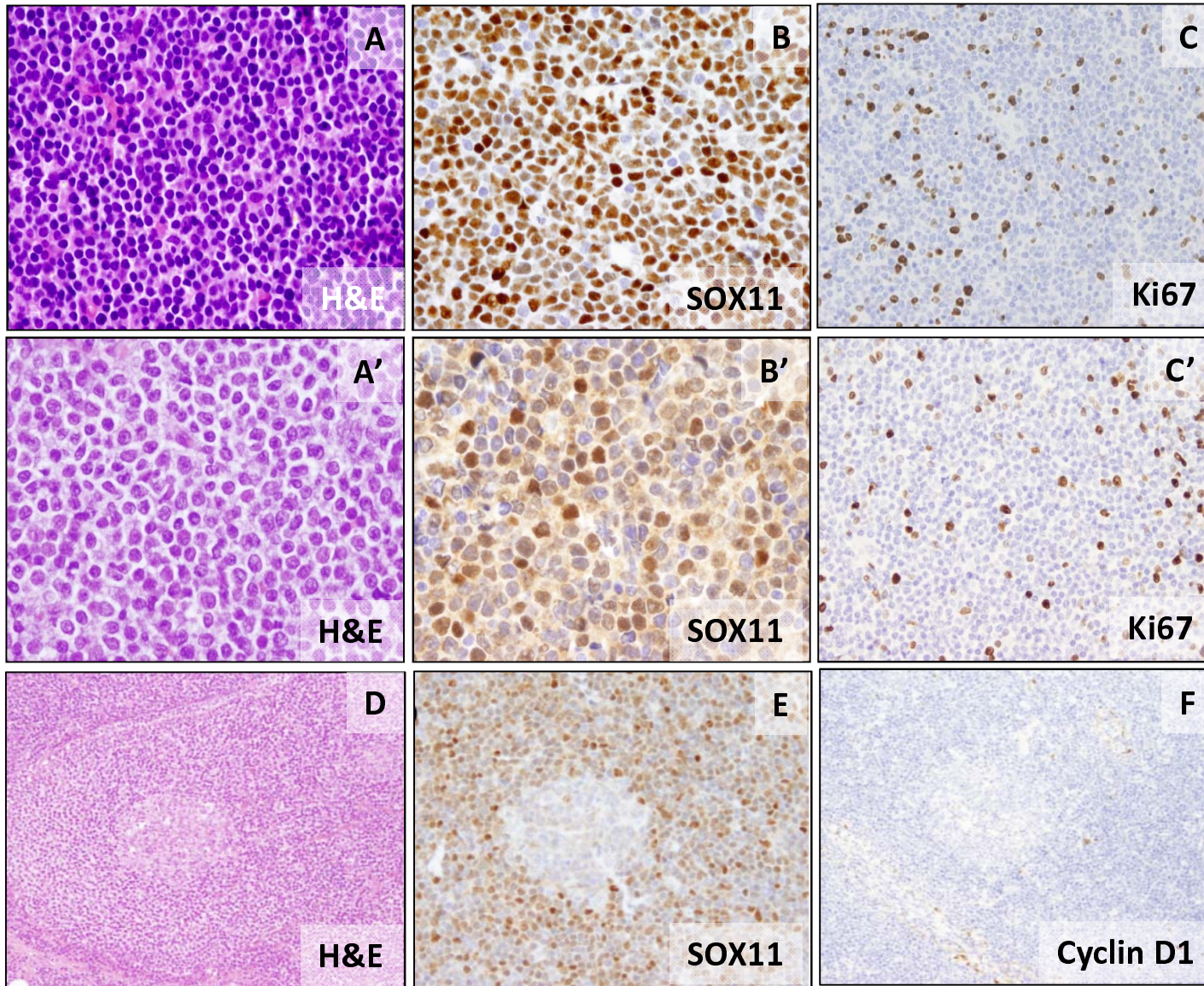


Figure 1

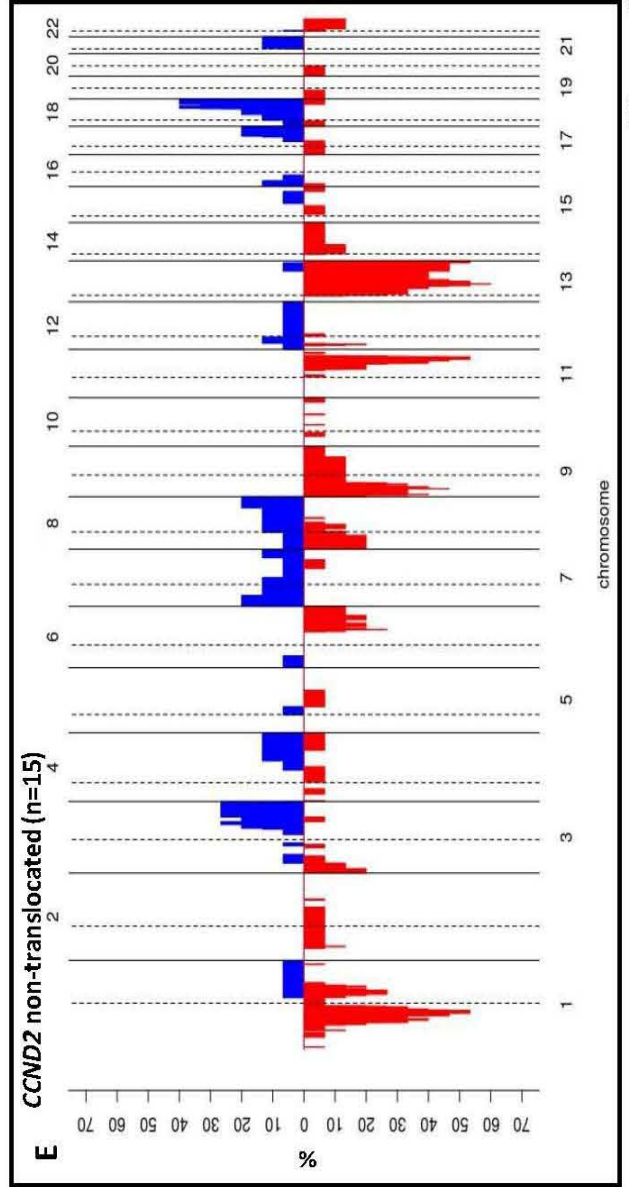
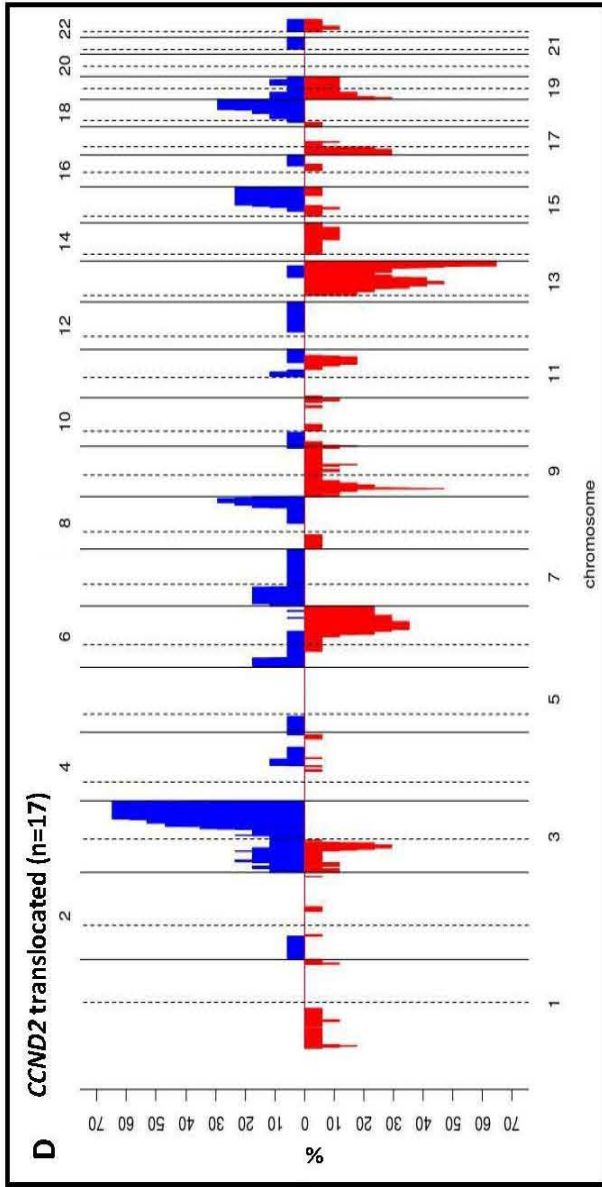
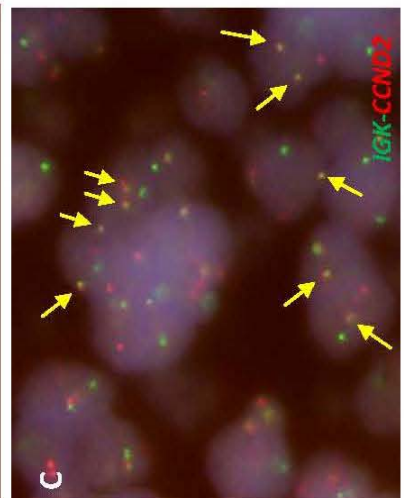
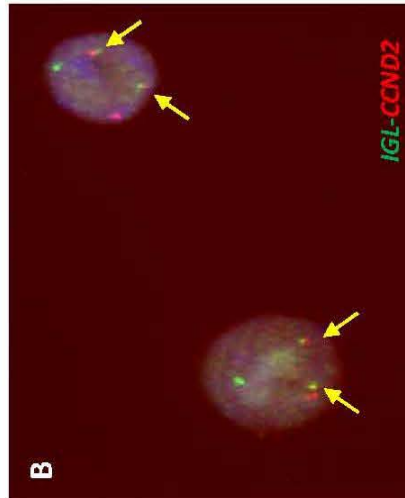
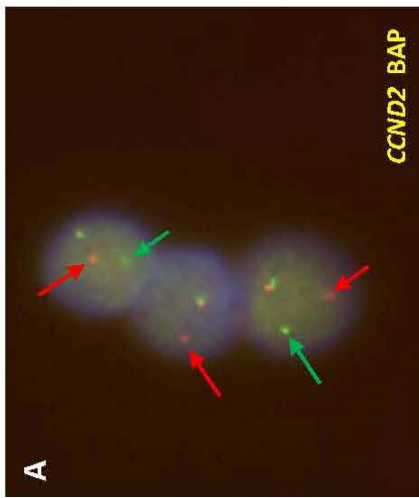


Figure 2

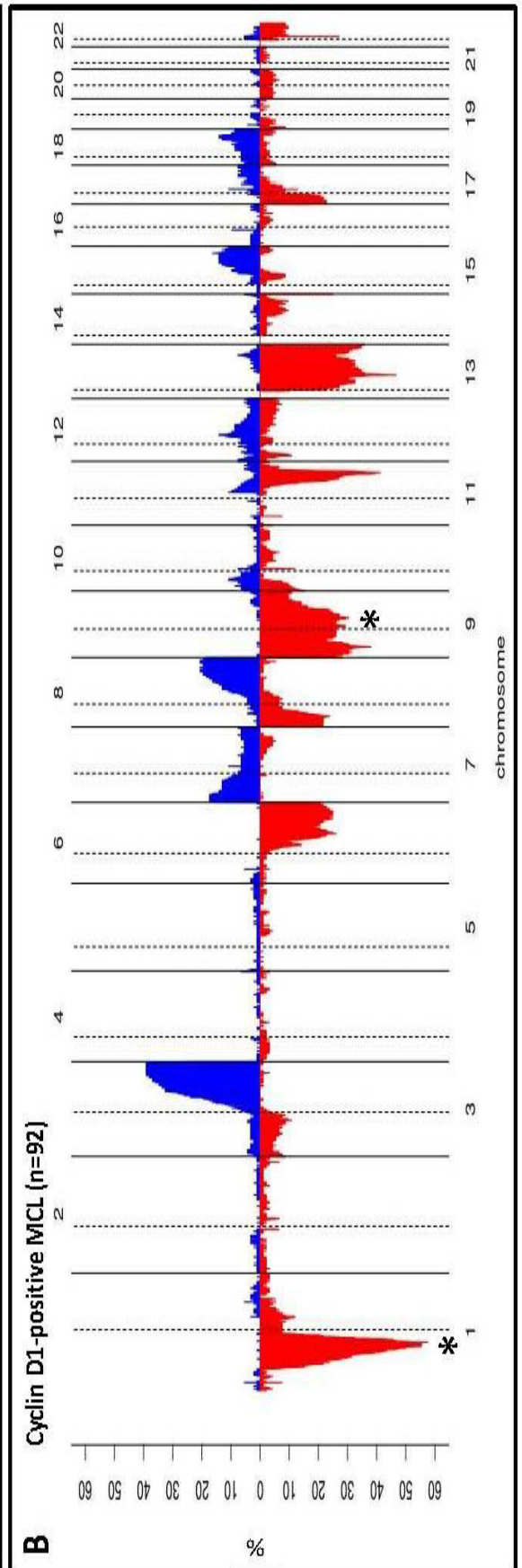
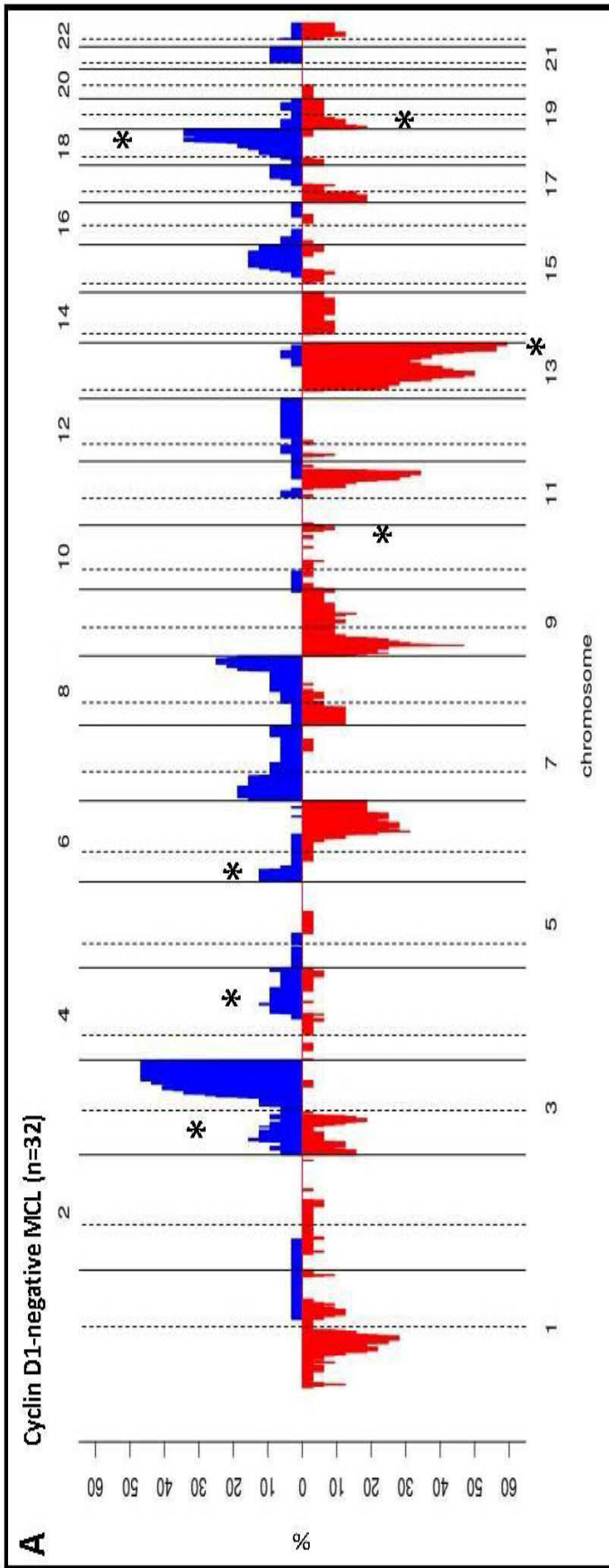


Figure 3

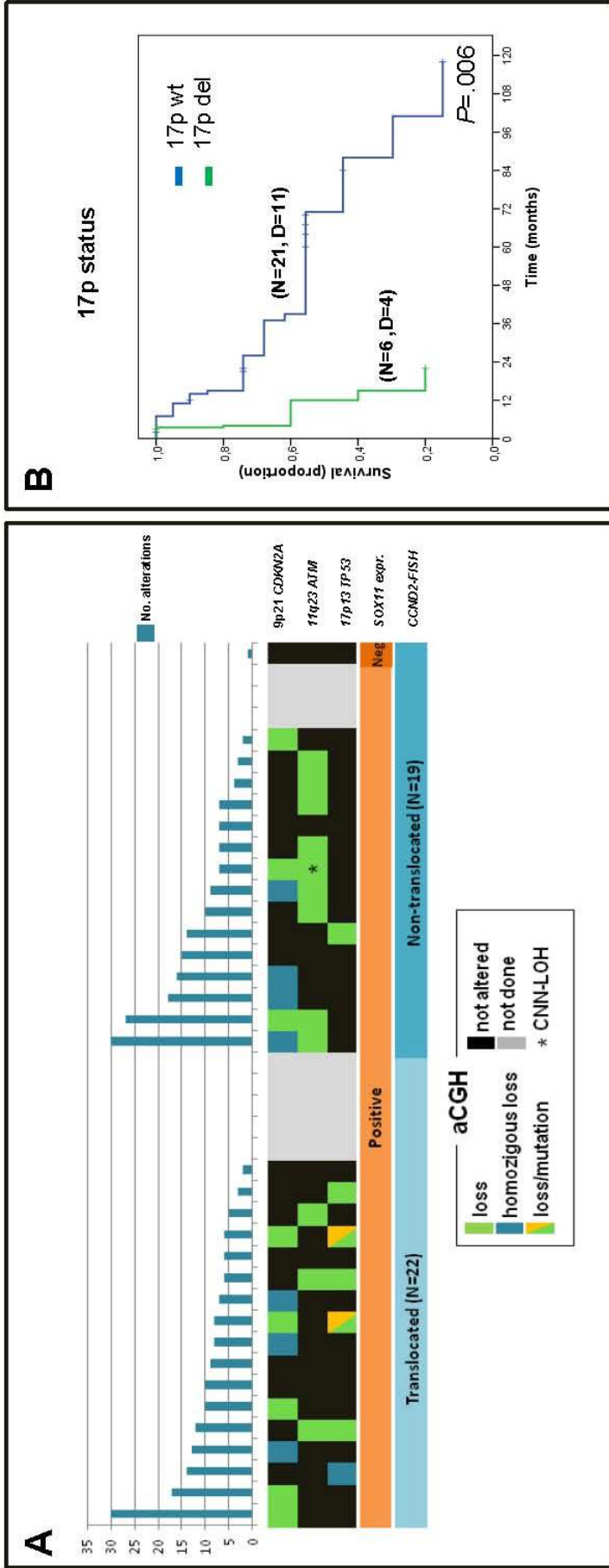


Figure 4

Supplementary Appendix

**CCND2 rearrangements are the most frequent genetic events
in Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma**

Salaverria et al.

I.	Supplemental Methods.....	3
II.	Supplemental Tables	6
III.	Supplemental Figures	22
IV.	Supplemental References	27

I. Supplemental Methods

FISH analysis

For the detection of the t(11;14)(q13;q32) a LSI (Locus Specific Identifier) *IGH/CCND1* double-color, double-fusion probe was used (Abbott-Vysis, Downers Grove, IL). *IGH@* breaks were studied using *IGH* Dual Color, Break apart rearrangement Probe (Abbott-Vysis). For break-apart FISH assays of *CCND2*, *CCND3*, *IGK@*, and *IGL@*, appropriate BAC/PAC clones flanking the respective genes were selected using bioinformatic resources available at the University of California at Santa Cruz (<http://genome.ucsc.edu>). BAC/PAC clones were obtained from Invitrogen (Karlsruhe, Germany) and differentially labeled with Spectrum Orange or Spectrum Green (supplementary Table S2). Bacterial culture, BAC/PAC DNA isolation and labeling, probe preparation, and FISH were performed as previously described.¹

DNA extraction and array-comparative genomic hybridization (aCGH)

Genomic DNA was extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue (FFPE) blocks using the phenol-chloroform extraction method.² DNA quality control prior to hybridization was performed using standard protocols.³ All extracted DNAs had at least a PCR control gene band of 200 bp (nine of the cases with a band of 200 bp, five cases with 400 bp, six cases with 300 bp and one cases with a 600 bp amplification band), and therefore all of them were suitable for hybridization. aCGH was performed in all samples hybridizing 1.5 µg of the test DNA and 1.5 µg of a sex-matched reference DNA on SurePrint G3 Human aCGH Microarray 1M (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). The protocol Oligonucleotide Array-Based CGH for Genomic DNA Analysis (ULS

labeling for Blood, Cells, Tissues or FFPE) was used. aCGH hybridization was outsourced at qGenomics (www.qgenomics.com/). Protocol Version 3.1 was followed with slight modifications. Briefly, after digestion the DNA was fragmented (99°C for 40 min) and labeled. After hybridization slides were washed and fluorescence was assessed using an Agilent microarray scanner G2565CA (Agilent Technologies). Raw data were generated from scanned images using Agilent Feature Extraction Software (v10.7). Log₂ratios of background corrected values for tumor over normal DNA were calculated. Normalization was carried out on Agilent's CGH Analytics, integrated on the Genomic Workbench suite (v5.0). Detection of copy number alterations was performed using the Aberration Detection Method-2 (ADM-2) algorithm, implemented within the Agilent's genomics suite Genomic Workbench v5.0 and Nexus 6.0 Discovery Edition (Biodiscovery, El segundo, CA). The results were concordant with both algorithms. All alterations were confirmed by visual inspection of two different observers. Waves aCGH correction algorithm (WACA), based on GC content and fragment size adjusted was applied in several cases⁴. WACA efficiently removes the wave artifact, thereby greatly improving the accuracy of aCGH data analysis. Copy number variations/polymorphisms were identified and excluded from further analyses. Regions showing aberrant copy number changes were mapped according to the human reference sequence (NCBI36/hg18).

Cyclin D1, D2 and D3 and SOX11 gene expression assay

Total RNA was extracted from peripheral blood of three cases (ID17, ID36 and ID41) using the AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen, Germantown, MA). The

potential residual DNA was removed using the TURBO DNA-free™ Kit from Ambion (Applied Biosystems, Santa Clara, US). Complementary DNA synthesis was carried out from 500 ng of total RNA and the product was amplified and quantified using TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) as previously described.⁵ Cyclin D1, D2, D3 and E1 expression levels were evaluated using Gene Expression Assays-on-Demand Hs00765553_m1, Hs00153380_m1, Hs00236949_m1, and Hs01026536_m1, respectively (Applied Biosystems). Fluorescent probes TaqMan®MGB and primers were designed for evaluation of SOX11 expression using Primer Express® Version 2.0 (Applied Biosystems) probe: 5'-TTTTAACCACGGATAATTG-3', primer forward: 5'-CATGTAGACTAATGCAGCCATTGG-3', primer reverse: 5'-CACGGAGCACGTGTCAATTG-3'. We obtained an 87 bp amplicon for SOX11 that was suitable for FFPE material. The products were analyzed in a Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

II. Supplemental Tables

Supplemental Table S1. Genetical, morphological and immunophenotypical characteristics of 41 cyclin D1-negative lymphomas.

Case	Transl.	LN Involvement	Growth pattern	Morphology	Mitosis	SOX11	CD5	p27	Ki67*	CD10	CD23
ID1	neg	LN (inguinal)	diffuse, monotonous	classical	1.6/hpf	pos	pos	neg	low	-	neg
ID2	neg	LN (multiple)	diffuse	classical	3.6/hpf	pos	pos	neg	-	-	neg
ID3	neg	LN	nodular	classical	2.4/hpf	pos	pos	neg	-	-	neg
ID4	neg	LN (multiple)	diffuse	classical	2.2/hpf	pos	pos	neg	-	-	w/pos
ID5	neg	LN	nodular	classical	-	pos	pos	neg	-	-	neg
ID6	neg	LN	nodular	classical	-	pos	pos	neg	-	-	neg
ID7	D2-K	LN (inguinal)	vaguely nodular, monotonous	classical	1.6/hpf	pos	pos	neg	-	neg	neg
ID8	neg	no	diffuse	classical	0.8/hpf	pos	pos	w/neg	low	neg	neg
ID9	neg	LN	diffuse	classical	0.2/hpf	pos	pos	w/neg	low	neg	neg
ID10	D2-K	LN	diffuse	classical	0.2/hpf	pos	pos	-	low	-	-
ID11	neg	LN (multiple)	diffuse	classical	1.2/hpf	pos	pos	w	low	neg	neg
ID12	neg	LN (inguinal)	vaguely nodular, diffuse	classical	0.1/hpf	pos	pos	neg	low	neg	neg
ID13	D2-K	LN (multiple)	nodular, diffuse, monotonous	classical	7/hpf	pos	pos	w	-	neg	neg
ID14	D2-H	LN (multiple)	diffuse	classical	-	pos	pos	neg	-	neg	neg
ID15	D2-K	LN (cervical)	diffuse	classical	-	pos	pos	neg	-	neg	neg
ID16	D2-?	LN (multiple)	diffuse	classical	-	pos	pos	neg	-	neg	neg
ID17	D2-K	LN (cervical)	diffuse	classical	-	pos (RT-PCR)	pos	-	-	neg	neg
ID18	D2-K	LN	vaguely nodular diffuse	classical	10/hpf	pos	pos	-	-	neg	-
ID23	neg	LN	diffuse	classical	10/hpf	pos w	w/neg	-	-	neg	-
ID24	D2-H	LN (cervical)	nodular	blastoid	4/hpf	pos	pos	-	high	-	neg
ID25	neg	LN (cervical)	vaguely	classical	1/hpf	pos	pos	w/neg	high	neg	neg

ID26	neg	LN (inguinal)	nodular vaguely nodular	classical	8/hpf	pos	pos	pos	high	neg	neg
ID27	neg	LN (inguinal)	nodular, GC remnants, DLBCL-like areas	classical + pleomorphic component	1.4/hpf	pos†	pos	pos†	low	neg	neg
ID28	D2-K	LN (inguinal)	nodular	classical	2/hpf	pos	pos	w/neg	high	neg	neg
ID29	D2- break	LN (cervical)	Diffuse	classical	1.2/hpf	pos	pos	w	high	pos in a subset of cells	neg
ID30	neg	LN (axillary)	nodular	classical	6/hpf	pos	pos	-	high	neg	neg
ID31	D2- break	LN (periaortic)	nodular	classical	6/hpf	pos	pos	w/neg	high		neg
ID32	D2-K	LN (axillary)	Diffuse	classical	3/hpf	pos	pos	neg	high	neg	neg
ID33	neg	LN	nodular	classical	0.2/hpf	pos	pos	-	-	neg	neg
ID34	D2-?	LN	nodular	classical	0.6/hpf	pos	pos	neg	low	neg	neg
ID35	D2-L	LN (multiple)	Diffuse	classical		pos	pos	neg	-	-	-
ID36	D2-L	LN (mutiple)	-	-	-	pos (GEP, RT-PCR)	pos	-	-	-	neg
ID37	D2-L	LN (mutiple)	nodular	classical	0.4/hpf	pos	pos	-	low	-	-
ID38	neg	LN (mutiple)	nodular	classical	0.8/hpf	pos	pos	w	low	neg	neg
ID39	D2-L	LN (cervical)	Diffuse	classical	1/hpf	pos	pos	w	high	neg	neg
ID40	D2-K	LN (multiple)	Diffuse	classical	2.4/hpf	pos	pos	neg	low	neg	neg
ID42	D2-L	LN (inguinal)	mantle zone	classical	0.2/hpf	pos	pos w	w	low	neg	neg
ID43	D2-H	LN (mediastinal, subcranial)	Diffuse	classical	1.2/hpf	pos	pos	w	low	-	neg
ID44	D2-K	LN (inguinal)	nodular	classical	1.6/hpf	pos	pos	neg	low	neg	neg
ID45‡	neg	LN	nodular	classical	1.2/hpf	neg	pos	w	low	neg	neg
ID46	neg	-	Diffuse	classical	(high)	pos	pos	-	low	neg	-

D2-? indicates *CCND2* with unidentified partner discarding *IGH@*, *IGK@* or *IGL@*; D2-break, *CCND2* with unidentified partner; LN, lymph node; pos, positive; neg, negative; -, not available-not evaluable; w, weak; hpf: high power field; transl., translocation.

* ≥35% Ki67 was considered high proliferation.

†negative in the large cell component.

‡This case was excluded due to its SOX11-negativity.

Supplemental Table S2. Probes used for fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analysis.

Probe name	Company	Chromosomal band	Fluorescent dye
LSI <i>IGH</i> @BAP	Abbott, IL	14q32	Spectrum green/ orange
LSI <i>IGH/CCND1</i>	Abbott, IL	14q32/11q13	Spectrum green/ orange
Clone name	Vector type	Genomic localization of insert*	Fluorescent dye
<i>CCND2 BAP</i>		12p13	
RP11-578L13	BAC	chr12:4,002,511-4,203,622	Spectrum orange
RP11-388F6	BAC	chr12:4,443,393-4,613,592	Spectrum green
<i>CCND3 BAP</i>		6p21	
RP5-973N23	PAC	41,802,166-41,918,671	Spectrum green
RP1-321B9	PAC	42,267,853-42,351,409	Spectrum orange
RP1-139D8	PAC	42,100,870-42,267,952	Spectrum orange
RP11-298J23	BAC	41,672,051-41,851,513	Spectrum green
<i>IGK@ BAP</i>		2p11	
RP11-316G9 (AC009958)	BAC	chr2:89,561,552-89,772,752	Spectrum orange
RP11-1021F11	BAC	chr2:88,767,510-88,939,350	Spectrum green
RP11-525L16 (AC104134)	BAC	chr2:88,570,647-88,680,773	Spectrum green
<i>IGL@ BAP</i>		22q11	
CTA-526G4 clone 60B5 (AC000102)	BAC	chr22:20,634,858-20,740,796	Spectrum green
CTA-865E9	BAC	chr22:21,835,020-21,838,494	Spectrum orange
		chr22:27,735,801-27,843,216	Spectrum orange

BAC indicates bacteria artificial chromosome; BAP, break apart probe; LSI, Locus Specific Identifier; PAC, P1-derived artificial chromosome.

*NCBI Build 36.1/hg18.

Supplemental Table S3. Primers used for mutational analysis of Cyclin D genes.

Primer	Sequence	Amplicon Length (bp)
<i>CCND1_F</i>	CAGCAGAACATGGACCC	
<i>CCND1_R</i>	AGAATGAAGCTTTCCCTTCTG	222
<i>CCND2_F</i>	GTGCTCCTCAATAGCCTG	
<i>CCND2_R</i>	TCTCTTTCGGCCCAACTG	137
<i>CCND3_F</i>	CCTCTCAGACCAGCTCCA	
<i>CCND3_R</i>	TAGATGTGGTGTGGTTCCT	194

Bp indicates base pairs; F, forward; R, reverse.

Supplemental Table S4. Expression of cyclin D2, D3 and E in cyclin D1-negative MCL measured by IHC, RT-PCR and GEP.

Case	Transl.	cyclin D2			cyclin D3			cyclin E1	
		IHC	qPCR	GEP	IHC	qPCR	GEP	IHC	qPCR
ID1	neg	pos		pos					
ID2	neg			pos					
ID3	neg	na			pos		pos		
ID4	neg	na			pos		pos		
ID5	neg	na			pos		pos		
ID8	neg	neg			pos				
ID9	neg	na	neg		pos	pos			neg
ID11	neg	pos w	pos		neg				
ID12	neg		pos			neg			neg
ID23	neg							pos	
ID26	neg		neg			neg		pos w	neg
ID27	neg		neg			neg			neg
ID30	neg								
ID33	neg				pos				
ID38	neg								
ID46	neg		pos			neg			neg
ID7	D2-K	pos			neg				
ID13	D2-K	pos	pos			neg			
ID14	D2-H		pos			neg			
ID15	D2-K		pos			neg			
ID16	D2-?		pos			neg			
ID17	D2-K		pos			neg			
ID18	D2-K	pos							
ID28	D2-K		pos			neg			neg
ID29	D2-break		pos			neg			neg
ID31	D2-break		pos			neg			
ID34	D2-?	pos	pos			neg			neg
ID35	D2-L		pos			neg			
ID36	D2-L			pos					
ID39	D2-L		pos			neg			neg
ID40	D2-K		pos			neg			neg

GEP indicates gene expression profiling; IHC, immunohistochemistry; pos, positive; qPCR, quantitative PCR; Transl., translocation; w, weak

Supplemental Table S5. Complete FISH results of 40 Cyclin D1-negative MCL.

ID	Transl. Status	CCND1 BAP	CCND2 BAP	CCND3 BAP	IGH@ BAP	IGK@ BAP	IGL@ BAP	IGH- CCND1	IGH- CCND2	IGK- CCND2	IGL- CCND2
ID1	neg	neg	neg	neg				neg			
ID2	neg	neg	neg	neg				neg			
ID3	neg	neg	neg	neg	neg*			neg			
ID4	neg	neg	neg	neg				neg			
ID5	neg	neg	neg	neg				neg			
ID6	neg	neg	neg	neg	neg*	neg*	neg*	neg			
ID7	D2-K		pos*		neg*	pos*	neg*	neg		pos*	
ID8	neg		neg	neg				neg			
ID9	neg		neg	neg				neg			
ID10	D2-K		pos	neg	neg*	pos*	neg*	neg			
ID11	neg		neg	neg				neg			
ID12	neg		neg	neg				neg			
ID13	D2-K	neg	pos	neg	neg	pos		neg		pos	
ID14	D2-H	neg	pos		pos				pos		
ID15	D2-K		pos			pos		neg		pos	
ID16	D2-?	neg	pos		neg	neg		neg			
ID17	D2-K	neg	pos		neg	pos		neg		pos	
ID18	D2-K	neg	pos	neg	neg	pos	neg			pos	
ID23	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg				
ID24	D2-H		pos	neg	pos	neg	neg	neg	pos		
ID25	neg		neg	neg				neg			
ID26	neg		neg	neg				neg			
ID27	neg		neg	neg				neg			
ID28	D2-K		pos		neg	pos	neg	neg		pos	
ID29	D2 break		pos		neg.	neg	neg	neg			
ID30	neg	neg	neg	na				neg			
ID31	D2-break		pos	neg	neg	neg	neg	neg			
ID32	D2-K		pos			pos		neg			
ID33	neg		neg	neg				neg			
ID34	D2-?		pos	neg				neg			
ID35	D2-L	neg	pos		neg	neg	pos				pos
ID36	D2-L		pos		neg	neg	pos	neg			pos
ID37	D2-L	neg	pos		neg	neg	pos	neg			
ID38	neg		neg	neg							
ID39	D2-L		pos		neg	neg	pos	neg			pos
ID40	D2-K		pos		neg	pos	neg	neg		pos	
ID42	D2-L		pos					neg	neg	neg	pos
ID43	D2-H		pos					neg	pos	neg	
ID44	D2-K		pos					neg	neg	pos	
ID46	neg		neg	neg				neg			

BAP indicates break apart probe; D2-?, CCND2 break with unidentified partner discarding IGH@, IGK@, IGL@; D2-break, CCND2 break with unidentified partner; neg, negative, pos: positive; transl, translocation.
*New FISH data of previously published cases.

Supplemental Table S6. Molecular data of 40 Cyclin D1-negative MCL.

Case	Transl. Status	CN array	No. CNA	9p21/ <i>CDKN2A</i>	11q23/ <i>ATM</i>	17p13/ <i>TP53</i>	<i>TP53</i> status	<i>CCND1</i> mut	<i>CCND2</i> mut	<i>CCND3</i> mut
ID1	neg	Affymetrix 500K /CGH	7	del	CNN-LOH	wt				
ID2	neg	Affymetrix 500K /CGH	2	del	wt	wt		wt	wt	wt
ID3	neg	Affymetrix 500K /CGH	27	del	del	wt		wt	wt	wt
ID4	neg	Affymetrix 500K /CGH	9	homo del	del	wt		wt	wt	wt
ID5	neg	Affymetrix 500K /CGH	10	wt	del	wt		wt	wt	wt
ID6	neg	Affymetrix 500K /CGH	7	wt	del	wt		wt	wt	wt
ID7	D2-K	na	na	na	na	na				
ID8	neg	Agilent 1M*	3	wt	del	wt		wt	wt	wt
ID9	neg	Agilent 1M*	7	wt	wt	wt		wt	wt	wt
ID10	D2-K	na	na	na	na	na				
ID11	neg	na	na	na	na	na				
ID12	neg	Agilent 1M*	4	wt	del	wt		wt	wt	wt
ID13	D2-K	Agilent 1M*	8	homo del	wt	wt				
ID14	D2 -H	Agilent 1M*	12	wt	del	del	na			
ID15	D2-K	Agilent 1M*	17	del	wt	wt				
ID16	D2-?	Agilent 1M*	10	del	wt	wt				
ID17	D2-K	Agilent 1M*	2	wt	wt	wt				
ID18	D2-K	Agilent 1M*	8	del	wt	del	exon 8 c.818G>A p.R273H			
ID23	neg	Agilent 1M*	16	homo del	wt	wt				
ID24	D2-H	na	na	na	na	na				
ID25	neg	Agilent 1M	15	wt	wt	wt		wt	wt	wt
ID26	neg	Agilent 1M	18	homo del	wt	wt		wt	wt	wt
ID27	neg	Agilent 1M	7	wt	del	wt		wt	wt	wt
ID28	D2-K	Agilent 1M	9	wt	wt	wt				
ID29	D2-neg	Agilent 1M	10	wt	gain	wt				
ID30	neg	Agilent 1M	30	homo del	del	wt			wt	wt

ID31	D2-neg	Agilent 1M	30	del	wt	wt	
ID32	D2-K	Agilent 1M	6	wt	del	del	na
ID33	neg	na	na	na	na	na	
ID34	D2-?	Agilent 1M	3	wt	wt	del	wt
ID35	D2-L	Agilent 1M	14	wt	wt	Small homo del	homo del (promoter-exon 1)
ID36	D2-L	Agilent 1M	7	homo del	wt	wt	
ID37	D2-L	Agilent 1M	6	wt	wt	wt	
ID38	neg	Agilent 1M	14	wt	wt	del	wt exon 7 and 10. Others na
ID39	D2-L	Agilent 1M	13	homo del	wt	wt	
ID40	D2-K	Agilent 1M	6	del	wt	del	exon 7 c.723delC p.S241fs*5
ID42	D2-L	Agilent 1M	5	wt	del	wt	
ID43	D2-H	na	na	na	na	na	
ID44	D2-K	na	na	na	na	na	
ID46	neg	na	na	na	na	na	

CN indicates copy number; CNN-LOH, copy number neutral-loss of heterozygosity; D2-?, *CCND2* break with unidentified partner discarding *IGH@*, *IGK@* and *IGL@* genes; D2-break, *CCND2* break with unidentified partner; del, deletion; homo del, homozygous deletion; mut, mutation; na, not available; neg, negative; transl., translocation; wt, wild type (no deletion/no CNN-LOH or no mutation).

*New copy number data of previously published cases.

Supplemental Table S7. Copy number alterations of 32 Cyclin D1-negative MCL.

Chromosome Region	Event	Length (bp)	Cytoband
ID1			
chr1:51,993,505-120,217,562	loss	68224057	p32.3-p12
chr1:120,233,802-145,938,656	loss	25704854	p12-q21.1
chr1:148,815,736-150,433,200	loss	1617464	q21.2-q21.3
chr1:152,683,489-164,496,493	loss	11813004	q21.3-q24.1
chr1:178,210,240-182,622,710	loss	4412470	q25.2-q25.3
chr8:180,568-38,755,604	loss	38575036	p23.3-p11.23
chr9:30,910-35,589,966	loss	35559056	p24.3-p13.3
ID2			
chr9:0-140,273,252	loss	140273252	p24.3-q34.3
chr13:16,000,001-114,142,980	loss	98142979	q11 - q34
ID3			
chr1:92833128-108105451	loss	15272323	p22.1-p13.3
chr3:122157217-143336624	gain	21179407	q13.33-q23
chr3:143391891-155982031	loss	12590140	q23-q25.2
chr3:155991502-199322068	gain	43330566	q25.2-q29
chr4:19099-1869140	loss	1850041	p16.3
chr6:99676430-107549664	loss	7873234	q16.2-q21
chr6:114619068-124346399	loss	9727331	q22.1-q22.31
chr8:180568-4155262	loss	3974694	p23.3-p23.2
chr8:4164397-12517929	loss	8353532	p23.2-p23.1
chr8:12632654-39663381	loss	27030727	p23.1-p11.22
chr8:39928509-41380701	loss	1452192	p11.21
chr8:41481725-47059642	loss	5577917	p11.21-q11.1
chr8:47064078-47847875	gain	783797	q11.1
chr8:47851472-49520992	loss	1669520	q11.1-q11.21
chr8:49687681-49820725	loss	133044	q11.21
chr8:49838874-77957795	gain	28118921	q11.21-q21.11
chr8:78051789-85298711	gain	7246922	q21.11-q21.2
chr8:85305933-87855113	loss	2549180	q21.2-q21.3
chr8:87858448-146264218	gain	58405770	q21.3-q24.3
chr9:3697057-3763822	loss	66765	p24.2
chr9:4272942-97248353	loss	92975411	p24.2-q22.32
chr9:98238862-109511513	loss	11272651	q22.33-q31.2
chr9:110631769-110750958	loss	119189	q31.3
chr11:95814925-116253431	loss	20438506	q21.3-q23.3
chr13:16,000,001-114,142,980	loss	98142979	q11 - q34
chr22:15405346-17348025	gain	1942679	q11.1-q22.1
chr22:21967766-49519949	loss	27552183	q11.23-q13.33
ID4			
chr3:107,270,190-199322,068	gain	92051878	q13.11-q29
chr4:53,377,961-96,814,371	loss	43436410	q12-q22.3
chr9:21,757,404-22,231,938	homo del	474534	p21.3
chr11:84,251,805-114,988,378	loss	30736573	q14.1-q23.2
chr13:85,305,104-114,092,980	loss	28787876	q31.1-q34
chr14:19,865,555-45,099,437	loss	25233882	q11.2-q21.3
chr15:53,360,818-86,623,678	gain	33262860	q21.3-q25.3
chr15:86,625,685-100,210,760	loss	13585075	q25.3-q26.3
chr17:51,265,658-78,605,474	gain	27339816	q22-q25.3
ID5			

chr1:73,687,779-89,945,089	loss	16257310	p31.1-p22.2
chr1:92,498,763-106,592,214	loss	14093451	p22.1-p21.1
chr1:107,364,675-112,046,454	loss	4681779	p13.3-p13.2
chr1:149,495,781-178,520,303	loss	29024522	q21.2-q25.2
chr3:41,866-47,887,707	loss	47845841	p26.3-p21.31
chr3:70,451,282-75,779,859	loss	5328577	p14.1-p12.3
chr3:75,879,418-79,985,503	loss	4106085	p12.3
chr11:99,008,430-116,960,909	loss	17952479	q22.1-q23.3
chr12:36,144,018-43,299,888	loss	7155870	q11-q12
chr20:17,408-28,143,658	loss	28126250	p13-q11.1
ID6			
chr3:135,289,282-199,322,068	gain	64032786	q22.1-q29
chr4:112,976,431-191,306,043	gain	78329612	q25-q35.2
chr11:93,480,063-113,841,400	loss	20361337	q21-q23.2
chr13:49,167,094-50,232,139	loss	1065045	q14.3
chr13:85,422,217-108,460,875	gain	23038658	q31.1-q33.3
chr13:108,469,059-114,092,980	loss	5623921	q33.3-q34
chr18:61,496,779-76,115,554	gain	14618775	q22.1-q23
ID8			
chr1:68,813,528-118,010,981	loss	49197454	p31.2 - p12
chr11:102,431,516-116,476,458	loss	14044943	q22.3 - q23.3
chr12:10,972,665-14,943,904	loss	3971240	p13.2 - p12.3
ID9			
chr1:73,978,016-121,233,935	loss	47255920	p31.1 - p11.1
chr1:152,015,948-170,010,522	loss	17994575	q21.3 - q24.3
chr1:174,539,409-176,471,597	loss	1932189	q25.2
chr12:12,774,282-15,124,635	loss	2350354	p13.1 - p12.3
chr13:17,920,058-114,142,980	loss	96222923	q11 - q34
chr18:86,595-14,980,964	loss	14894370	p11.32 - p11.21
chr18:49,103,401-76,117,153	gain	27013753	q21.2 - q23
ID12			
chr1:89,671,879-119,855,488	loss	30183609	p22.2 - p12
chr7:136,173-80,019,908	gain	79883735	p22.3 - q21.11
chr7:135,249,024-158,767,981	gain	23518957	q33 - q36.3
chr11:79,476,627-114,249,985	loss	34773358	q14.1 - q23.2
ID13			
chr1:74,410,664-79,209,473	loss	4798810	p31.1
chr3:119,704,364-165,177,987	gain	45473624	q13.32 - q26.1
chr3:165,223,275-199,501,827	high gain	34278553	q26.1 - q29
chr3:29,751,203-34,407,204	gain	4656002	p24.1 - p22.3
chr6:91,289,881-170,899,992	loss	79610112	q15 - q27
chr9:21,073,742-22,513,201	homo del	1439460	p21.3
chr13:38,594,462-57,403,763	loss	18809302	q13.3 - q21.1
chr13:82,780,288-88,825,160	loss	6044873	q31.1 - q31.3
ID14			
chr1:233,483,703-247,249,719	loss	13766017	q42.3 - q44
chr3:146,954,760-199,274,862	gain	52320103	q24 - q29
chr3:68,259,584-82,217,903	loss	13958320	p14.1 - p12.2
chr7:180,684-43,725,580	high gain	43544897	p22.3 - p13
chr7:43,725,580-158,640,740	gain	114915161	p13 - q36.3
chr8:71,679,759-141,964,056	gain	70284298	q13.3 - q24.3
chr11:78,806,216-117,595,915	loss	38789700	q14.1 - q23.3
chr15:76,070,289-100,293,722	loss	24223434	q24.3 - q26.3
chr17:89,619-3,405,506	loss	3315888	p13.3

chr18:12,141,770-75,884,693	gain	63742924	p11.21 - q23
chr18:86,595-12,123,324	loss	12036730	p11.32 - p11.21
chrX:176,239-154,737,515	gain	154561277	p22.33 - q28
ID15			
chr3:103,031,571-199,159,185	gain	96127615	q12.3 - q29
chr4:82,277,484-87,121,650	loss	4844167	q21.21 - q21.3
chr4:98,786,025-116,258,391	gain	17472367	q22.3 - q26
chr4:117,753,722-120,119,804	loss	2366083	q26
chr6:337,275-25,928,580	gain	25591306	p25.3 - p22.2
chr6:85,014,643-170,899,992	loss	85885350	q14.3 - q27
chr8:116,154,526-138,120,712	gain	21966187	q23.3 - q24.23
chr8:138,182,510-146,084,009	high gain	7901500	q24.23 - q24.3
chr9:21,779,871-23,781,282	loss	2001412	p21.3
chr9:134,894,698-140,273,252	gain	5378555	q34.13 - q34.3
chr11:59,501,681-71,585,570	gain	12083890	q12.1 - q13.4
chr12:49,085,265-132,198,966	gain	83113702	q13.13 - q24.33
chr13:37,528,238-74,926,621	loss	37398384	q13.3 - q22.2
chr13:100,433,003-114,142,980	loss	13709978	q32.3 - q34
chr15:49,779,890-100,338,915	gain	50559026	q21.2 - q26.3
chr19:72,596-63,739,055	gain	63666460	p13.3 - q13.43
chr22:15,489,707-49,634,900	gain	34145194	q11.1 - q13.33
ID16			
chr2:230,745,327-231,313,360	loss	568034	q37.1
chr3:62,244,056-84,397,240	loss	22153185	p14.2 - p12.1
chr3:128,142,008-199,067,780	gain	70925773	q21.3 - q29
chr8:114,816,427-146,054,649	gain	31238223	q23.3 - q24.3
chr9:20,094,175-33,737,685	loss	13643511	p21.3 - p13.3
chr10:122,294,405-129,001,459	loss	6707055	q26.12 - q26.2
chr10:129,937,783-132,104,961	loss	2167179	q26.2 - q26.3
chr13:99,532,408-114,142,980	loss	14610573	q32.3 - q34
chr15:32,530,368-100,131,521	gain	67601154	q14 - q26.3
chr22:22,900,000-30,774,569	loss	7874570	q11.23 - q12.3
ID17			
chr3:226,965-199,274,862	gain	199047898	p26.3 - q29
chr21:14,152,725-46,890,916	gain	32738192	q11.2 - q22.3
ID18			
chr1:234,554,474-237,835,442	loss	3280969	q42.3 - q43
chr2:134,331,342-146,899,054	loss	12567713	q21.2 - q22.3
chr3:0-199,501,827	gain	199501828	p26.3 - q29
chr6:194,425-26,682,076	gain	26487652	p25.3 - p22.1
chr9:20,608,317-32,351,699	loss	11743383	p21.3 - p21.1
chr15:38,792,251-48,275,906	loss	9483656	q15.1 - q21.2
chr17:0-22,135,792	loss	22135793	p13.3 - p11.1
chr19:0-63,811,651	loss	63811652	p13.3 - q13.43
ID23			
chr2:37,857,137-39,765,052	loss	1907916	p22.2 - p22.1
chr4:87,021,902-191,055,460	gain	104033559	q21.23 - q35.2
chr6:100,519,055-106,968,270	loss	6449216	q16.3 - q21
chr6:108,842,051-109,945,426	loss	1103376	q21
chr6:133,291,911-145,951,050	loss	12659140	q23.2 - q24.3
chr9:5,787,087-6,815,923	loss	1028837	p24.1
chr9:21,785,243-22,035,541	homo del	250299	p21.3
chr9:22,035,541-27,748,165	loss	5712625	p21.3 - p21.2
chr9:34,850,892-38,751,707	loss	3900816	p13.3 - p13.1

chr10:87,680,312-88,090,573	loss	410262	q23.1 - q23.2
chr10:89,654,536-90,171,763	loss	517228	q23.31
chr13:37,055,769-61,845,186	loss	24789418	q13.3 - q21.31
chr15:22,657,953-46,785,947	loss	24127995	q11.2 - q21.1
chr16:74,038-31,910,354	gain	31836317	p13.3 - p11.2
chr18:16,798,083-76,117,153	gain	59319071	q11.1 - q23
chr21:12,860,650-46,944,323	gain	34083674	q11.1 - q22.3

ID25

chr3:0-27,689,673	loss	27689674	p26.3 - p24.1
chr3:27,703,100-31,603,069	gain	3899970	p24.1 - p23
chr3:31,606,294-35,729,732	high gain	4123439	p23 - p22.3
chr3:35,733,527-51,846,193	gain	16112667	p22.3 - p21.1
chr3:75,958,756-84,186,801	gain	8228046	p12.3 - p12.1
chr3:124,837,607-199,501,827	gain	74664221	q21.1 - q29
chr5:49,580,889-72,351,948	gain	22771060	q11.1 - q13.2
chr5:72,396,367-118,201,085	loss	45804719	q13.2 - q23.1
chr8:0-75,198,612	loss	75198613	p23.3 - q21.11
chr10:123,084,428-135,374,737	loss	12290310	q26.12 - q26.3
chr13:45,086,087-114,142,980	loss	69056894	q14.12 - q34
chr14:17,546,581-106,368,585	loss	88822005	q11.1 - q32.33
chr18:50,362,627-76,080,308	gain	25717682	q21.2 - q23
chr19:72,596-24,174,380	loss	24101785	p13.3 - p12
chr22:15,150,516-49,691,432	loss	34540917	q11.1 - q13.33

ID26

chr1:143,432,108-247,249,719	gain	103817612	q21.1 - q44
chr4:142,330,704-191,273,063	loss	48942360	q31.21 - q35.2
chr6:0-33,088,385	gain	33088386	p25.3 - p21.32
chr6:105,229,233-170,899,992	loss	65670760	q21 - q27
chr7:0-30,339,319	gain	30339320	p22.3 - p15.1
chr9:0-21,959,807	loss	21959808	p24.3 - p21.3
chr9:21,959,807-22,027,830	homo del	68024	p21.3
chr9:22,027,830-30,700,306	loss	8672477	p21.3 - p21.1
chr10:27,967,434-38,665,781	loss	10698348	p12.1 - p11.21
chr11:57,402,170-63,452,380	loss	6050211	q12.1 - q13.1
chr12:17,029,319-132,349,534	gain	115320216	p12.3 - q24.33
chr13:21,363,962-57,006,562	loss	35642601	q12.11 - q21.1
chr17:49,101,131-78,774,742	gain	29673612	q22 - q25.3
chr18:0-56,546,645	gain	56546646	p11.32 - q21.32
chr18:61,526,155-76,117,153	loss	14590999	q22.1 - q23
chr21:14,152,725-46,944,323	gain	32791599	q11.2 - q22.3
chrX:0-10,750,556	loss	10750557	p22.33 - p22.2
chrX:78,161,130-154,913,754	gain	76752625	q21.1 - q28

ID27

chr1:80,619,100-85,090,543	loss	4471444	p31.1 - p22.3
chr1:99,871,298-109,071,469	loss	9200172	p21.2 - p13.3
chr2:167,393,190-170,790,488	loss	3397299	q24.3 - q31.1
chr8:57,195,231-69,304,008	loss	12108778	q12.1 - q13.2
chr8:115,177,456-146,274,826	gain	31097371	q23.3 - q24.3
chr11:75,473,101-117,610,184	loss	42137084	q13.5 - q23.3
chr18:48,394,049-76,117,153	gain	27723105	q21.2 - q23

ID28

chr1:59,457,106-110,871,182	loss	51414077	p32.1 - p13.3
chr3:47,829,355-68,228,276	gain	20398922	p21.31 - p14.1
chr13:94,004,590-114,142,980	loss	20138391	q32.1 - q34

chr15:38,765,310-42,992,281	loss	4226972	q15.1 - q21.1
chr15:43,020,462-100,338,915	gain	57318454	q21.1 - q26.3
chr18:47,954,940-76,117,153	high gain	28162214	q21.2 - q23
chr19:0-7,912,935	loss	7912936	p13.3 - p13.2
chrY:2,563,305-18,074,587	gain	15511283	p11.31 - q11.221
chrY:19,257,651-27,210,470	loss	7952820	q11.22 - q12

ID29

chr1:5,731,947-9,577,458	loss	3845512	p36.31 - p36.22
chr3:148,977,817-199,501,827	gain	50524011	q24 - q29
chr6:92,147,279-127,338,511	loss	35191233	q16.1 - q22.33
chr11:58,583,917-77,398,073	gain	18814157	q12.1 - q14.1
chr11:98,046,539-134,452,384	gain	36405846	q22.1 - q25
chr13:51,221,123-68,670,806	loss	17449684	q14.3 - q21.33
chr13:68,682,477-100,508,153	gain	31825677	q21.33 - q33.1
chr13:100,508,171-114,127,451	loss	13619281	q33.1 - q34
chr19:0-19,818,636	gain	19818637	p13.3 - p12
chr19:40,062,439-55,007,746	gain	14945308	q13.11 - q13.33

ID30

chr1:33,485,277-34,856,481	loss	1371205	p35.1 - p34.3
chr1:37,950,366-40,203,347	loss	2252982	p34.3 - p34.2
chr1:40,762,476-42,278,709	loss	1516234	p34.2
chr1:43,708,473-46,315,579	loss	2607107	p34.2 - p34.1
chr1:5,714,458-6,789,871	loss	1075414	p36.31
chr1:51,495,144-53,559,489	loss	2064346	p32.3
chr1:66,938,205-74,368,743	loss	7430539	p31.3 - p31.1
chr1:77,599,391-85,721,054	loss	8121664	p31.1 - p22.3
chr1:86,226,477-86,936,769	loss	710293	p22.3
chr1:92,007,479-121,052,453	loss	29044975	p22.1 - p11.2
chr1:143,597,231-159,736,731	loss	16139501	q21.1 - q23.3
chr1:161,239,479-175,980,553	loss	14741075	q23.3 - q25.2
chr1:182,837,574-185,658,629	loss	2821056	q25.3 - q31.1
chr1:235,994,921-237,567,794	loss	1572874	q43
chr2:33,314,713-44,243,800	loss	10929088	p22.3 - p21
chr2:47,539,929-148,147,686	loss	100607758	p21 - q22.3
chr3:31,760-12,545,019	loss	12513260	p26.3 - p25.1
chr6:105,758,502-170,899,992	loss	65141491	q21 - q27
chr7:105,253,295-129,532,052	loss	24278758	q22.2 - q32.2
chr9:21,917,964-32,189,162	homo del	10271199	p21.3 - p21.1
chr9:3,538,540-21,878,969	loss	18340430	p24.2 - p21.3
chr9:32,189,162-39,146,954	loss	6957793	p21.1 - p13.1
chr10:58,968,027-60,093,859	loss	1125833	q21.1
chr11:106,731,698-114,299,361	loss	7567664	q22.3 - q23.2
chr11:123,309,407-126,282,577	loss	2973171	q24.1 - q24.2
chr11:78,627,253-79,720,573	loss	1093321	q14.1
chr11:80,163,644-82,876,083	loss	2712440	q14.1
chr11:95,266,025-95,876,733	loss	610709	q21
chr12:9,867,619-16,404,236	loss	6536618	p13.31 - p12.3
chr13:18,194,544-114,142,980	loss	95948437	q11 - q34

ID31

chr2:6,819-576,621	loss	569802	p25.3
chr2:795,628-65,054,286	gain	64258658	p25.3 - p14
chr2:65,087,982-69,651,854	loss	4563872	p14
chr3:68,749-10,115,254	loss	10046505	p26.3 - p25.3
chr3:10,307,233-17,419,855	gain	7112622	p25.3 - p24.3

chr3:17,421,189-58,556,421	loss	66373407	p24.3 - p14.2
chr3:58,556,422-59,636,927	gain	1080505	p14.2
chr3:59,636,928-83,794,596	loss	24157668	p14.2-p12.1
chr4:95,351,472-97,821,365	loss	2469893	q22.2 - q22.3
chr4:97,908,661-149,148,031	gain	51239370	q22.3 - q31.23
chr4:172,766,175-183,888,171	loss	11121996	q34.1 - q35.1
chr4:183,897,426-190,286,409	gain	6388983	q35.1 - q35.2
chr6:44,345,592-137,291,465	loss	92945873	p21.1 - q23.3
chr6:137,291,466-138,816,901	gain	1525435	q23.3
chr6:138,816,902-156,192,098	loss	17375196	q23.3-q25.3
chr6:156,192,099-158,435,910	gain	2243811	q25.3
chr6:158,435,911-170,701,979	loss	12266068	q25.3-q27
chr7:136173-52685750	gain	52549577	p22.3 - p12.1
chr9:6591209-44199601	loss	37608392	p24.1 - p11.2
chr9:85112843-90024559	loss	4911716	q21.32 - q22.1
chr10:126161-2749287	loss	2623126	p15.3
chr10:2766712-38476892	gain	35710180	p15.3 - p11.21
chr10:42882274-60893302	loss	18011028	q11.21 - q21.1
chr10:107640100-112960080	loss	5319980	q25.1 - q25.2
chr10:126429421-135285845	loss	8856424	q26.13 - q26.3
chr13:18361437-114105156	loss	95743719	q11 - q34
chr13:49162155-50902584	homo del	1740429	q14.3
chr16:58424523-88827254	gain	30402731	q21-qter
chr18:37290171-76116226	gain	38826055	q12.3 - q23
chr19:3329679-5377839	loss	2048160	p13.3

ID32

chr1:2,891,601-7,282,760	loss	4391160	p36.32 - p36.23
chr3:64,657,420-82,604,850	loss	17947431	p14.1 - p12.2
chr3:127,905,418-199,419,815	gain	71514398	q21.3 - q29
chr11:88,279,111-115,999,479	loss	27720369	q14.3 - q23.3
chr17:0-15,862,491	loss	15862492	p13.3 - p12
chr18:46,495,596-76,117,153	gain	29621558	q21.2 - q23

ID34

chr3:137,317,818-199,430,186	gain	62112369	q22.2 - q29
chr13:18,049,914-114,013,125	loss	95963212	q11 - q34
chr17:0-37,460,571	loss	37460572	p13.3 - q21.2

ID35

chr3:120,717,330-199,501,827	gain	78784498	q13.33 - q29
chr6:0-100,323,545	gain	100323546	p25.3 - q16.3
chr6:100,327,723-170,899,992	loss	70572270	q16.3 - q27
chr9:70,154,146-75,911,108	loss	5756963	q13 - q21.13
chr10:0-12,378,074	loss	12378075	p15.3 - p13
chr13:44,766,611-67,847,797	loss	23081187	q14.12 - q21.33
chr13:90,509,280-114,142,980	loss	23633701	q31.3 - q34
chr15:46,415,909-100,338,915	gain	53923007	q21.1 - q26.3
chr16:45,058,242-63,073,190	loss	18014949	q11.2 - q21
chr17:4,925,707-7,447,513	loss	2521807	p13.2 - p13.1
chr17:7,447,513-7,515,707	homo del	68195	p13.1
chr17:7,515,707-22,200,000	loss	14684294	p13.1 - q11.1
chr17:35,614,061-37,604,226	loss	1990166	q21.2
chr18:22,373,429-76,117,153	gain	53743725	q11.2 - q23

ID36

chr8:0-39,450,836	loss	39450837	p23.3 - p11.23
chr8:129,357,472-140,613,631	gain	11256160	q24.21 - q24.3

chr9:134,764,651-140,273,252	loss	5508602	q34.13 - q34.3
chr9:21,203,515-22,082,128	homo del	878614	p21.3
chr10:0-1,457,845	loss	1457846	p15.3
chr11:0-4,331,622	loss	4331623	p15.5 - p15.4
chr19:0-19,818,636	loss	19818637	p13.3 - p12
ID37			
chr1:0-55,413,191	loss	55413192	p36.33 - p32.3
chr5:205,754-44,031,380	gain	43825627	p15.33 - p12
chr7:6,685,316-53,482,527	gain	46797212	p22.1 - p12.1
chr13:95,209,783-114,142,980	loss	18933198	q32.1 - q34
chr14:59,600,968-93,854,901	loss	34253934	q23.1 - q32.13
chr19:0-63,811,651	loss	63811652	p13.3 - q13.43
ID38			
chr4:20,287,021-35,043,814	loss	14756793	p15.31 - p15.1
chr7:0-158,821,317	gain	158821318	pter-qter
chr8:0-146,264,902	gain	146264903	pter-qter
chr12:33654-33968005	gain	33934351	p13.33 - p11.1
chr13:43415370-114115907	loss	70700537	q14.11 - q34
chr16:37,360-2,068,695	loss	2031335	p13.3
chr16:2,191,556-4,325,681	gain	2134125	p13.3
chr16:5,731,466-5,771,994	loss	40528	p13.3
chr16:5,791,237-664,4817	gain	853580	p13.3 - p13.2
chr16:6,660,422-8,066,557	loss	1406135	p13.2
chr16:8,090,486-16,169,516	gain	8079030	p13.2 - p13.11
chr17:48,658-38,550,415	loss	38501757	p13.3-q21.31
chr17:36,381,308-78,653,589	gain	42272281	q21.2-qter
chr18:32,868,064-76,116,226	gain	43248162	q12.2 - q23
ID39			
chr3:0-26,997,021	loss	26997022	p26.3 - p24.1
chr3:27,004,907-45,264,320	high gain	18259414	p24.1 - p21.31
chr3:59,801,661-76,296,630	loss	16494970	p14.2 - p12.3
chr3:88,780,987-90,391,757	loss	1610771	p11.2 - p11.1
chr3:101,938,062-103,852,930	gain	1914869	q12.2 - q12.3
chr6:105,736,247-144,652,990	loss	38916744	q21 - q24.2
chr9:1,471,834-2,400,093	loss	928260	p24.3 - p24.2
chr9:14,666,611-17,621,523	loss	2954913	p22.3 - p22.2
chr9:21,203,515-22,408,114	homo del	1204600	p21.3
chr9:22,408,114-24,561,146	loss	2153033	p21.3
chr9:33,977,890-37,590,163	loss	3612274	p13.3 - p13.2
chr9:88,325,406-89,792,312	loss	1466907	q21.33 - q22.1
chr13:97,113,864-114,142,980	loss	17029117	q32.2 - q34
ID40			
chr3:122,031,782-199,501,827	gain	77470046	q13.33 - q29
chr8:122,476,421-146,274,826	gain	23798406	q24.12 - q24.3
chr9:0-140,273,252	loss	140273253	p24.3 - q34.3
chr13:28,720,872-114,142,980	loss	85422109	q12.3 - q34
chr15:18,378,345-38,012,353	loss	19634009	q11.1 - q15.1
chr17:0-22,135,792	loss	22135793	p13.3 - p11.1
ID42			
chr11:93,107,599-113,904,326	loss	20796728	q21 - q23.2
chr13:18,309,625-46,228,556	loss (subclonal)	27918932	q11 - q14.2
chr13:46,589,758-114,142,980	loss	67553223	q14.2 - q34
chr14:18,635,679-106,368,585	loss (subclonal)	87732907	q11.1 - q32.33
chr22:14,867,857-49,691,432	loss (subclonal)	34823576	q11.1 - q13.33

Bp indicates base pairs; del: deletion; homo del, homozygous deletion.

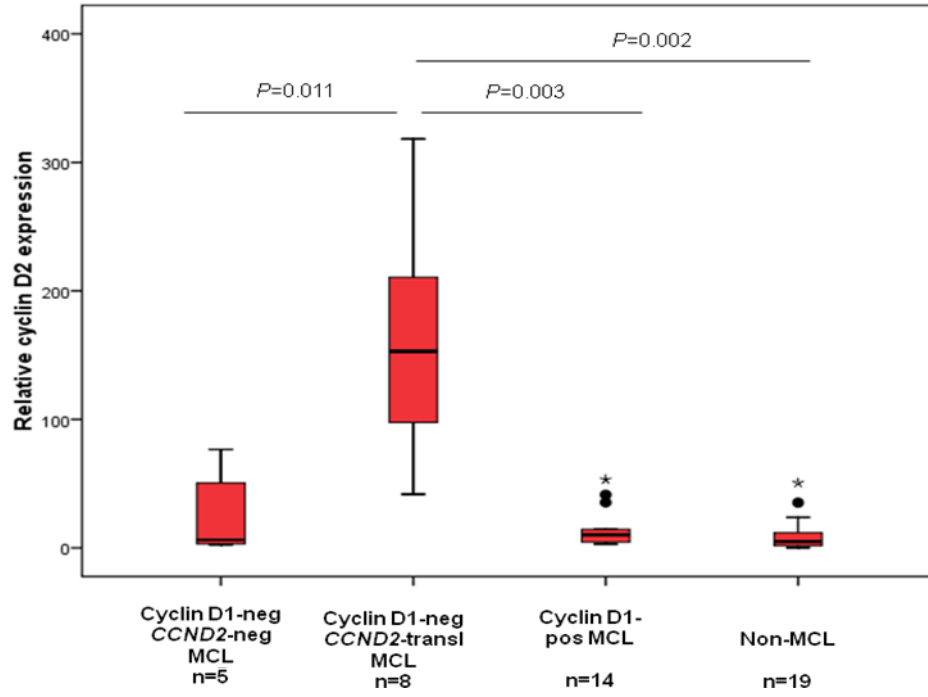
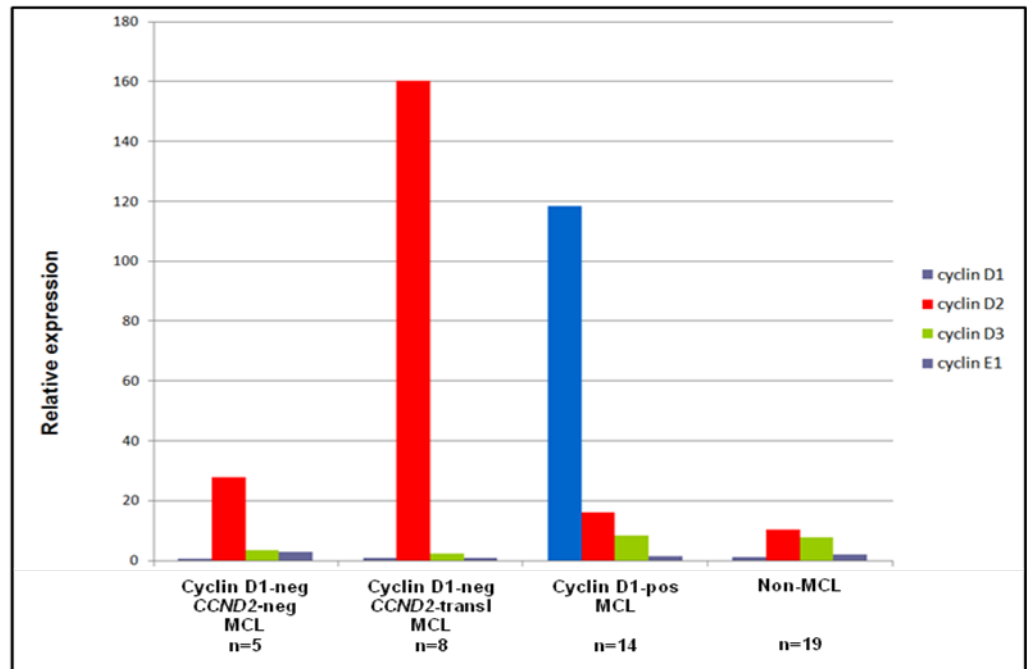
Supplemental Table S8. Chromosomal regions (>5Mb) characteristic of cyclin D1 positive- and -negative MCL.

Cyclin D1-negative vs. Cyclin D1-positive MCL		
Region	Size (Mb)	Chr. Band
Frequent Deletions		
chr10:126429421-132104961	5,68	10q26.13-q26.3
chr13:100433003-114142980	13,71	13q32.3-q34
chr19:4368845-17399478	13,03	19p13.3-p13.11
Frequent Gains		
chr3:27703100-36473790	8,77	3p24.1-p22.3
chr4:110232094-125093640	14,86	4q25-q28.1
chr4:143344366-149148031	5,80	4q31.21-q31.23
chr6:5869499-26682076	20,81	6p25.1-p22.1
chr18:46495596-76117153	29,62	18q21.2-q23
CyclinD1-positive vs. Cyclin D1-negative		
Region	Size (Mb)	Chr. Band
Frequent Deletions		
chr1:55413191-103469102	48,06	1p32.3-p21.1
chr9:78852665-98238862	19,39	9q21.13-q22.33

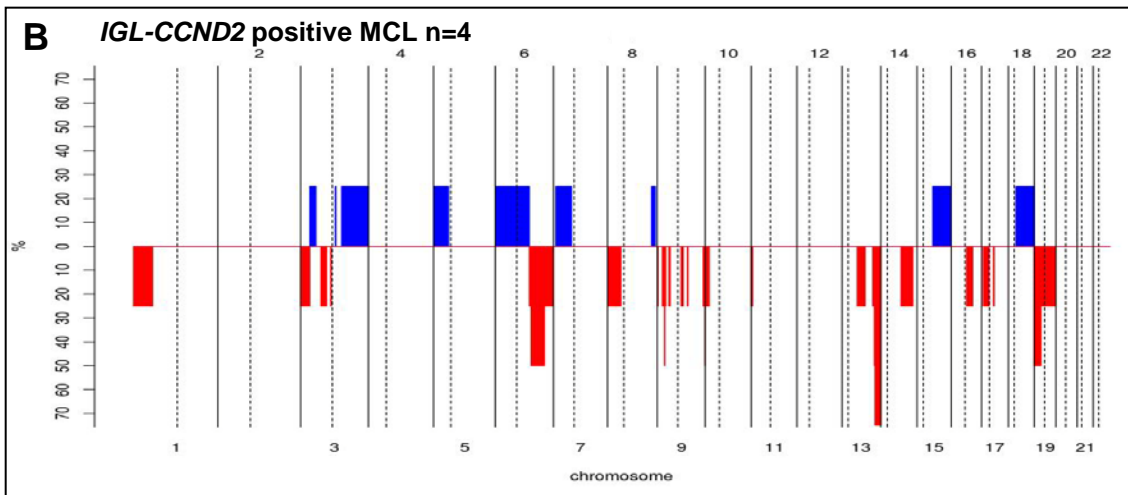
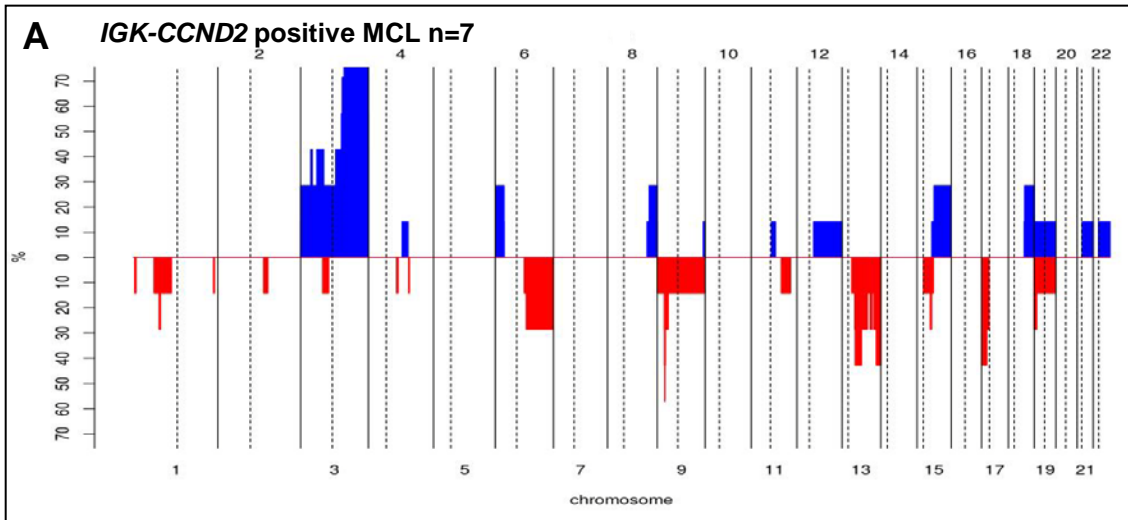
Chr, indicates chromosome; Mb, megabases.

III. Supplemental Figures

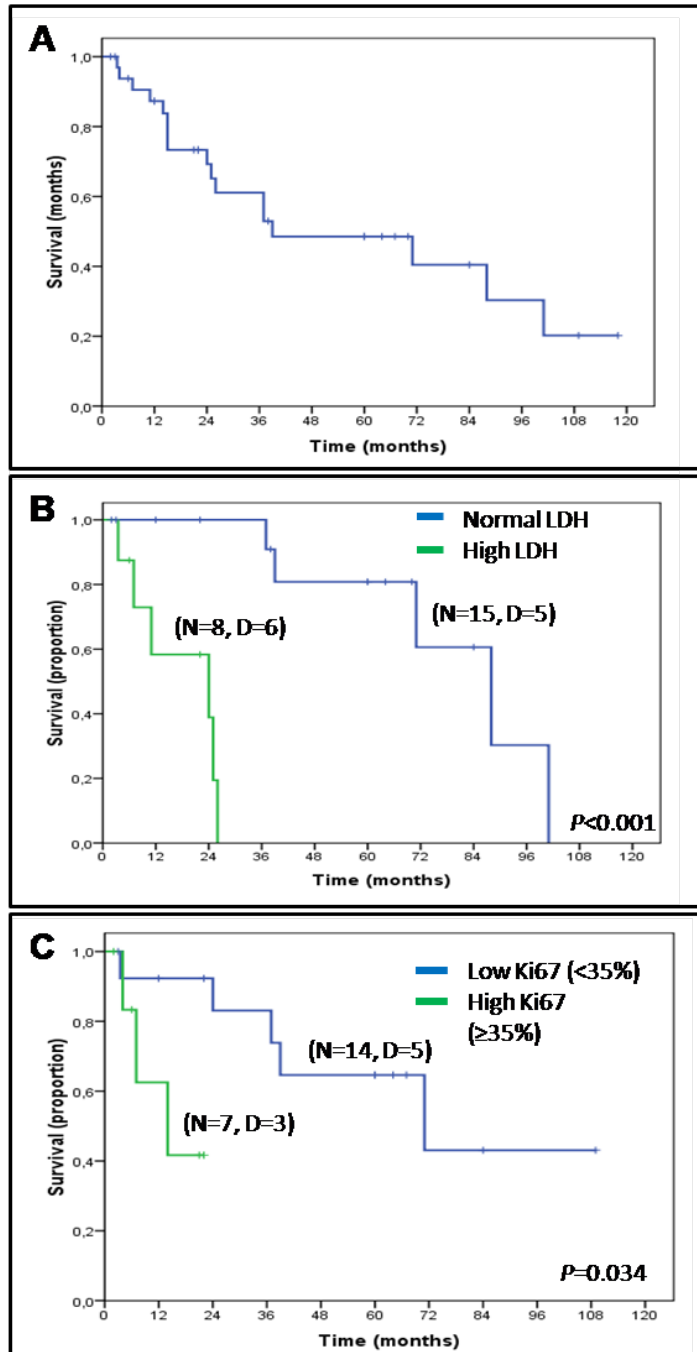
Supplemental Figure S1. Cyclin D1, D2, D3 and E1 expression analyzed by qPCR in lymphoid neoplasms. (A) Box plot representing cyclin D2 expression and **(B)** bar plot with cyclin D1, D2, D3 and E1 expression analyzed in cyclin D1-negative MCL with presence/absence of *CCND2* rearrangements, in MCL cyclin D1-positive and in other lymphoid neoplasms non-MCL.

A**B**

Supplemental Figure S2. Frequency of genetic alterations in *CCND2*-translocated MCL. (A) *IGK-CCND2* translocation MCL (n=7) and (B) *IGL-CCND2* translocation MCL(n=4). In the X-axis the chromosomes are represented horizontally from 1 to 22, in the Y-axis is represented the percentage of cases showing the copy number alterations. Gains are represented in the positive Y-axis and colored in blue, whereas losses are represented in the negative Y-axis in red.



Supplemental Figure S4. Kaplan-Meier curves of Cyclin D1-negative/SOX11-positive MCL representing (A) whole series (5-year OS 48%, 95% CI, 28.4-67.6); (B) normal and high serum LDH levels; and (C) high ($\geq 35\%$) and low ($< 35\%$) expression of Ki67 proliferation marker. N, number of patients; D, dead patients.



IV. Supplemental References

1. Nagel I, Szczepanowski M, Martin-Subero JI et al. Deregulation of the telomerase reverse transcriptase (TERT) gene by chromosomal translocations in B-cell malignancies. *Blood* 2010;116(8):1317-1320.
2. Zettl A, Strobel P, Wagner K et al. Recurrent genetic aberrations in thymoma and thymic carcinoma. *Am.J.Pathol.* 2000;157(1):257-266.
3. van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2003;17(12):2257-2317.
4. Lepretre F, Villenet C, Quief S et al. Waved aCGH: to smooth or not to smooth. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(7):e94.
5. Royo C, Navarro A, Clot G et al. Non-nodal type of mantle cell lymphoma is a specific biological and clinical subgroup of the disease. *Leukemia* 2012; 26(8):1895-1898.

TRABAJO N°3

El linfoma de células del manto sin afectación ganglionar es un subgrupo clínico y biológico específico de la enfermedad

(Leukemia, 26:1895-8, 2012)

RESUMEN

El linfoma de células del manto sin afectación ganglionar es un subgrupo clínico y biológico específico de la enfermedad

Un subgrupo de pacientes de linfoma de células del manto (MCL) sigue un curso clínico indolente y puede necesitar diferentes estrategias de tratamiento comparado con los pacientes de MCL convencionales. Sin embargo, los criterios para reconocer estos pacientes no están bien definidos. El objetivo de este trabajo fue determinar si la firma de expresión diferencial entre los MCL convencionales e indolentes podía identificar subgrupos de MCL con diferentes características. Analizamos una firma de tres genes (*SOX11*, *HDGFRP3*, *DBN1*) mediante qRT-PCR con muestras tumorales de sangre periférica de 68 pacientes de MCL. Identificamos una expresión baja de estos genes en un subgrupo de 22 pacientes que principalmente no presentaban adenopatías, contenían mutaciones en los genes de las *IG*, tenían pocas alteraciones genómicas, y presentaban mejor pronóstico que los 46 casos de MCL con expresión elevada de esta firma (supervivencia a los 5 años, 75% vs 32%, $P=0.006$). La presencia de alteraciones en *17p/TP53* confería un peor pronóstico en ambos grupos, independientemente de la alta o baja expresión de la signatura. Este hallazgo sugiere que los MCL sin presentación ganglionar y baja expresión de los 3 genes de la firma, son un subtipo específico de la enfermedad. El estudio de los tres genes y el estado mutacional de *17p/TP53* podría ayudar en la elaboración de estrategias de tratamiento en este tipo de pacientes.



LETTER TO THE EDITOR

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

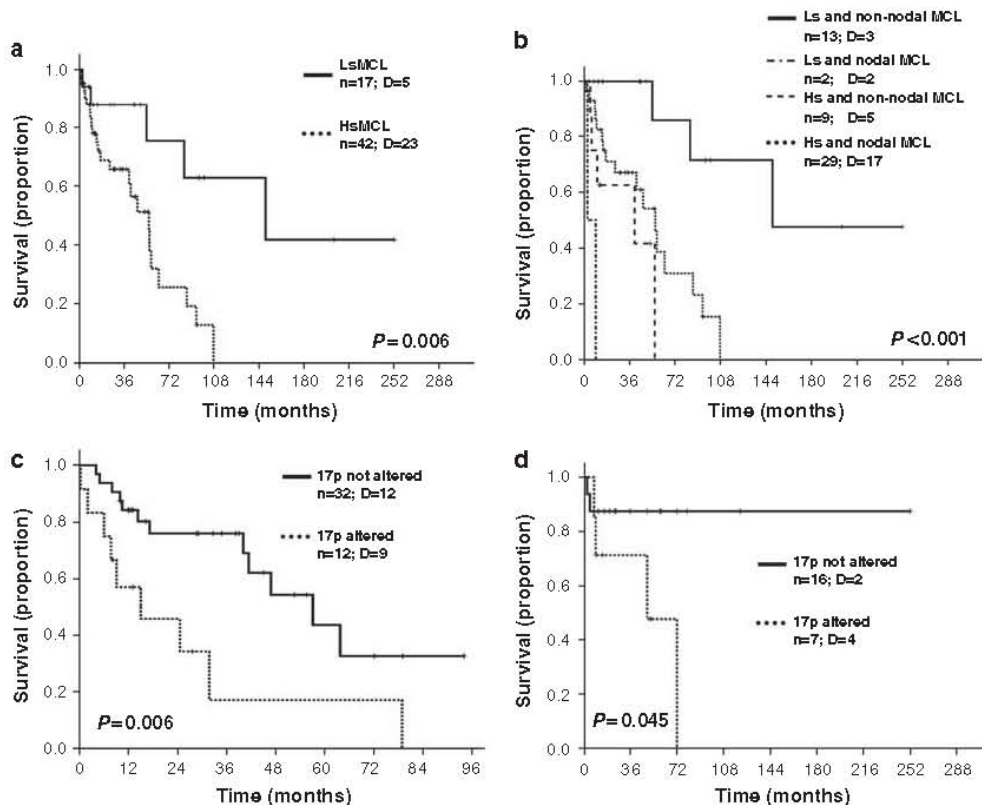


Figure 1. Survival curves of MCL. (a) Kaplan–Meier estimates of OS for 59 MCL patients according to the high (HsMCL, $n = 42$) or low (LsMCL, $n = 17$) expression of the three-gene signature. Two out of the five dead patients in the LsMCL group died of a MCL-unrelated cause but all patients in the HsMCL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

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

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

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

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

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

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

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

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

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

C Royo^{1,13}, A Navarro^{1,13}, G Clot¹, I Salaverria^{1,2}, E Giné³, P Jares¹, D Colomer¹, A Wiestner⁴, WH Wilson⁴, MC Vegliante¹, V Fernandez¹, EM Hartmann⁵, N Trim⁶, WN Erber⁷, SH Swerdlow⁸, W Klapper⁹, MJS Dyer¹⁰, M Vargas-Pabón¹¹, G Ott¹², A Rosenwald⁹, R Siebert², A López-Guillermo³, E Campo^{1,14} and S Bea^{1,14}

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

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

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

⁴Hematology Branch, National Institute of Health,

Bethesda, MD, USA;

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

⁶Addenbrooke's Hospital, Cambridge, UK;

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

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

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

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

¹¹Hospital de Jario, Asturias, Spain and

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

Stuttgart, Germany

E-mail: sbea@clinic.ub.es

¹³These authors share authorship.

¹⁴These authors share senior authorship.

REFERENCES

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

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

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

Supplementary information to the manuscript by Royo *et al* entitled: “Non-nodal type of mantle cell lymphoma is a specific biological and clinical subgroup of the disease”

1. Supplementary Patients and methods

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

2. Supplementary results

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

3. Supplementary tables

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

4. Supplementary figures

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

5. Supplementary references

1. Supplementary Patients and methods

1.1 Patients

We initially selected 17 MCL patients from our previous gene expression profiling (GEP) study to design a quantitative polymerase chain reaction (qPCR) assay that could capture the information of the GEP signature distinguishing indolent and conventional MCL.¹ These patients were selected based on the availability of RNA to design a qPCR assay. This assay was compared in relation to the GEP data in this initial set of cases (n=17). Then, it was used in a second independent series (n=68) of MCL patients. The patients were included in the study based on the availability of a peripheral blood sample for molecular studies obtained before treatment. All cases had the t(11;14)(q13,q32) and/or cyclin D1 overexpression. The patients were collected between 1992 and 2010 from Health Centers in Spain, Germany, United Kingdom, and United States. None of these patients had been included in our previous study.¹ Since the qPCR analysis was performed in peripheral blood samples, a minimum of 30% of tumor cells was required to include patients in the study, regardless of the total lymphocyte count. This cut-off was selected based on dilutional experiments performed to evaluate the sensitivity of the assay. Clinical follow-up was available in 59 patients. In nine patients sequential leukemic samples were also analyzed.

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

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

1.2 Isolation of tumor cells and nucleic acid extraction

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

1.3 Quantitative PCR and design of a 3-gene signature

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

standardized genes. For each gene the standardization was performed by subtracting the mean and then dividing by the standard deviation.

1.4 IGHV gene mutational status

The study of the *IGHV* mutational status was performed in 64 MCL using genomic DNA or cDNA. The *IGHV-IGHD-IGHJ* amplification was performed as reported previously² or following the BIOMED-2 protocol.³ For the analysis we used all the sequences that were in-frame and excluded any partial or unproductive rearrangements. PCR products were purified by excising the band from a 2% agarose gel with the NucleoSpin Extract II Kit (Machery-Nagel). PCR amplicons were subjected to direct sequencing. The sequences were aligned to immunoglobulin sequence database – IMGT® databases, IMGT/V-Quest tool (<http://www.imgt.org>) and Ig BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast>). We classified the cases in two different groups: patients with mutated *IGHV* ($\leq 97\%$ homology with the germline gene) and patients with non-mutated *IGHV* ($>97\%$ homology).²

1.5 Copy number analysis

Copy number alterations and loss of heterozygosity (LOH) of 53 MCL leukemic cases was investigated with the Genome-Wide Human SNP Array 6.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA). Briefly, 500ng of tumor DNA was digested with NspI and StyI restriction enzymes, and ligated to adaptors. After ligation and PCR, the DNA was fragmented, labeled and hybridized. The hybridizations were performed using the high throughput protocol. The arrays were washed using Affymetrix fluidics station and scanned with the Gene Chip Scanner 3000. Image data were analyzed with Affymetrix GeneChip Command Console software version 1.1 following the manufacturer's recommendations. Data analysis was performed using the Genotyping Console 4.0 to obtain the CEL data files. For array quality control genotypes were called using Birdseed v2.0, and only samples passing the recommended values for Contrast Quality Control (CQC) >0.4 and Median of the Absolute values of all Pairwise Differences (MAPD)

<0.35 were used. CN5 algorithm of the Affymetrix Genotyping Console was used with normal references from the public HapMap Sample Data Set (270 samples). Regional GC correction and the standard segment reporting tool filters were used (minimum of 5 markers per segment and 100 Kb minimum genomic size of a segment) as well as visual inspection of copy number alterations (CNA). SNP6.0 arrays were hybridized at CeGen, Santiago de Compostela, Spain (www.cegen.org). Nine samples subjected to copy number analysis had tumor contents lower than 70% (range 52%-68%) as detected by flow cytometry, although this did not affect significantly the detection of copy number alterations, as we have also previously observed using SNP array 100K.⁴

1.6 TP53 mutational analysis

The detection of the *TP53* gene mutations was investigated as described in the International Agency for Research on Cancer (IARC) Consortium within exons 4-11. The mutations were analyzed using Multiple Sequence Alignment tools (ClustalW; <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>) and the wild type sequences from the IARC Database (<http://www-p53.iarc.fr>). All mutations were confirmed in both the forward and reverse strands and the presence of deleterious mutations (non-functional protein) was obtained from IARC Database.

1.7 Statistical analysis

Statistical tests were performed using SPSSv17 (SPSS, Chicago, IL, USA) and R softwares. A hierarchical clustering using the Ward's method with Euclidean distances was used to segregate groups based on the qPCR expression of the three genes. The independence between clinical parameters and the groups of patients was evaluated using Chi square or Fisher's exact test. Survival was estimated with the Kaplan-Meier method and survival curves were compared using the log-rank test. *P* values less than 0.05 were considered statistically significant. Overall survival (OS) was defined as time from MCL diagnosis to death as a result of any cause or date of last follow-up. The genetic analyses (SNP6.0

array and 17p/*TP53* alterations) were investigated either at or shortly (<5 months) following diagnosis in 45 of 53 MCL and before treatment in all of them. The impact of genetic analysis on survival was determined from the time of the sample assessment instead of time from MCL diagnosis.

2. Supplementary results

2.1 Design of a simplified 3-gene signature qPCR assay

In a previous study¹ using GEP we identified a gene signature of 13 genes highly expressed in conventional MCL and underexpressed in indolent MCL. In the present study, we developed a simple qPCR assay that could be useful to identify this signature without the need to perform a GEP analysis. First, we analyzed by qPCR the expression levels of seven genes of the signature (*SOX11*, *HDGFRP3*, *DBN1*, *HMGB3*, *PON2*, *CDK2AP1*, and *RNGTT*) in patients of the initial study, 7 with low and 10 with high expression levels of the signature. Similarly to the GEP analysis,¹ none of the genes individually could accurately identify all the cases. A combination of at least three genes performed better: all cases with the low GEP signature had very low expression of at least two of them. The three genes finally selected were *SOX11*, *HDGFRP3*, and *DBN1* based on the higher correlation coefficient ($R^2 > 0.82$) between their respective mRNA expression levels detected by GEP and qPCR, and their higher specificity to identify MCL in comparison to leukemic non-MCL lymphomas (Supplementary Table S1, and Figures S1 and S2).

2.2 Sequential analysis of the 3-gene signature

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

3. Supplementary tables

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

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

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

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

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

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

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

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

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

† Alteration present in subpopulation;

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

§ Patient with no lymphadenopathy at diagnostic but with nodal presentation at the moment of molecular analyses; || Deleterious mutations (non-functional protein) in IARC database, except in cases cMCL52,

lsMCL20 and hsMCL29 which are not available.

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

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

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

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

Supplementary figures

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

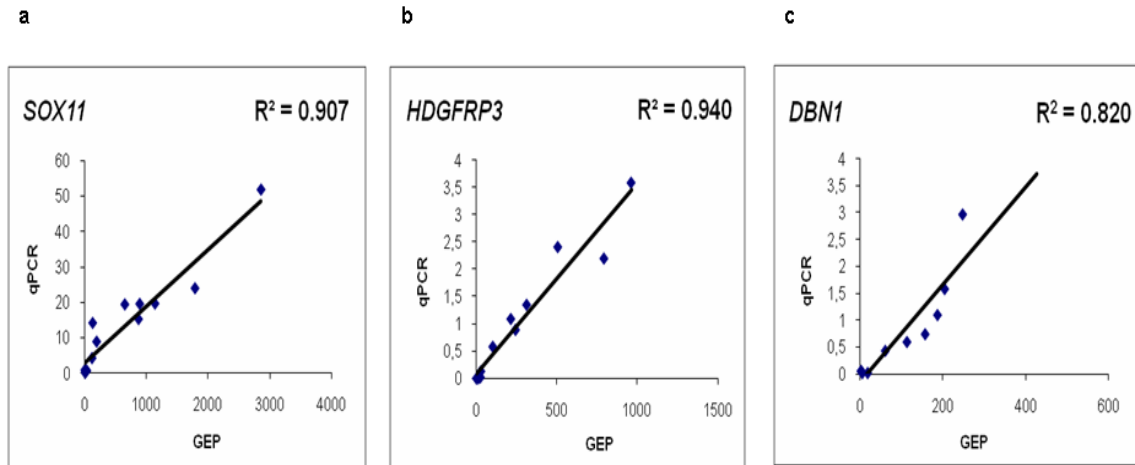


Figure S2. Box-plots of the relative expression of *CCND1* (a), *SOX11* (b), *HDGFRP3* (c), and *DBN1* (d) analyzed by qPCR in two series of leukemic MCL (initial set: 17 MCL and independent set: 68 MCL) and 42 leukemic non-MCL neoplasms. The four genes were significantly more expressed in MCL than in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

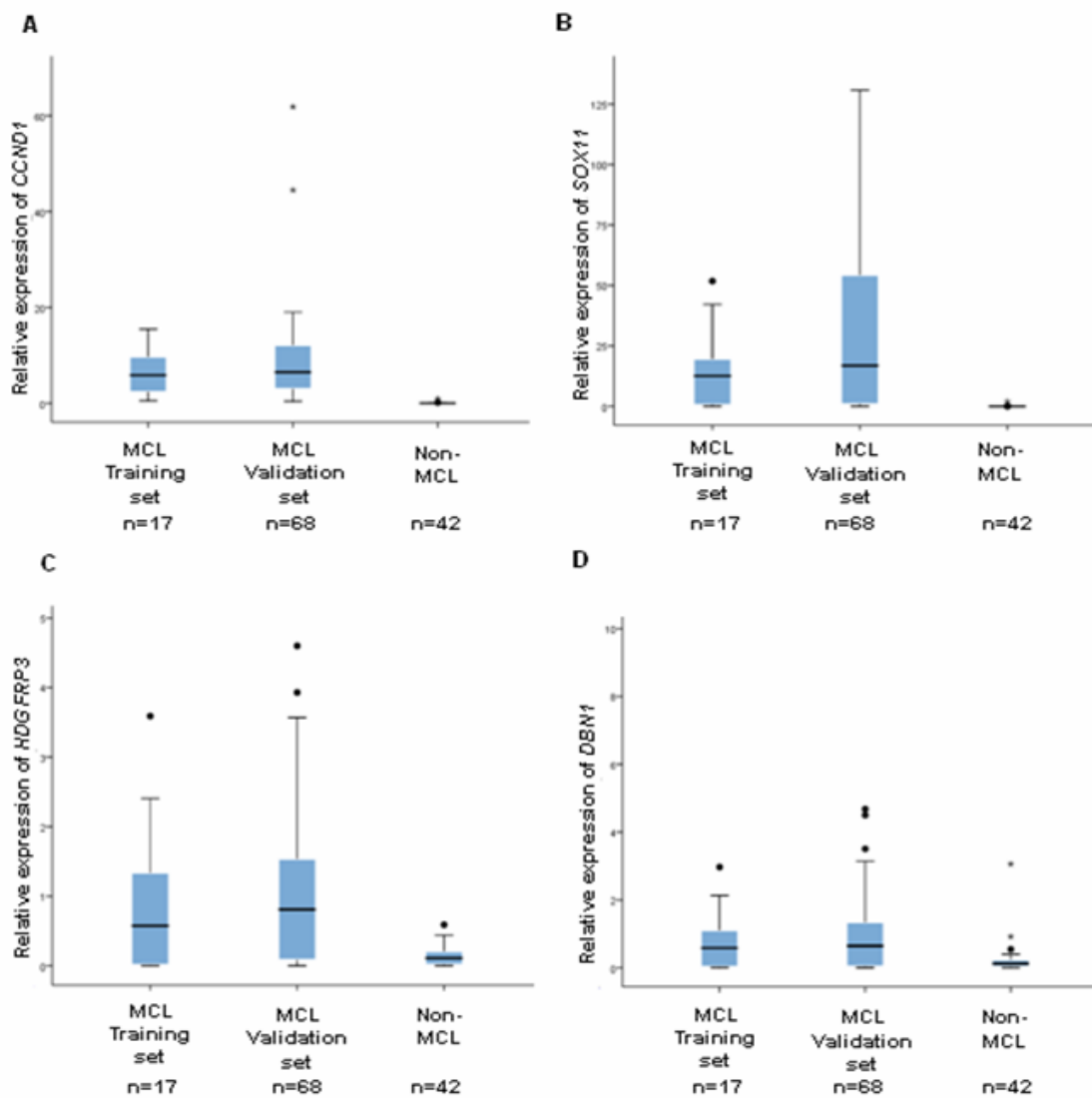


Figure S3. Unsupervised hierarchical clustering of 68 MCL based on the combination of the gene expression of *SOX11*, *HDGFRP3* and *DBN1* performed by quantitative PCR. Two subgroups of patients were segregated according to the high (hsMCL) or low (lsMCL) expression of the 3-gene signature. The relative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

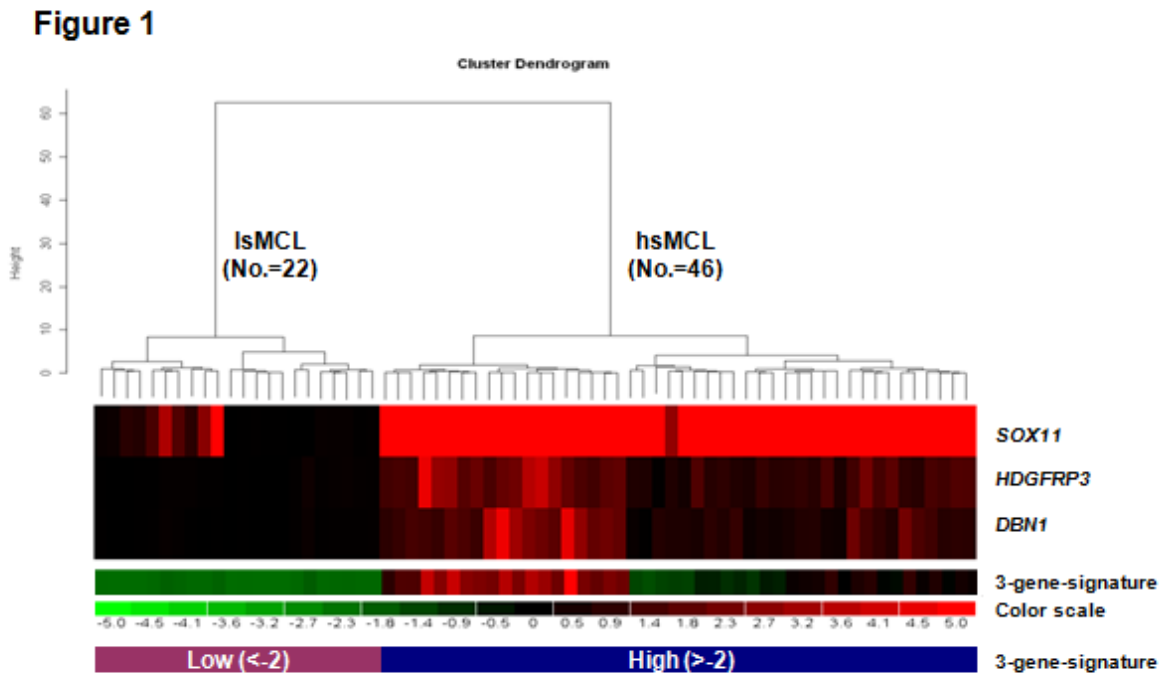


Figure S4. Expression levels of the 3-gene signature in MCL patients. Box-plot of the normalized 3-gene signature in the two subgroups of MCL. The cases in the low signature MCL (lsMCL) subgroup showed normalized values below -2 whereas the cases in the high signature MCL (hsMCL) subgroup showed levels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

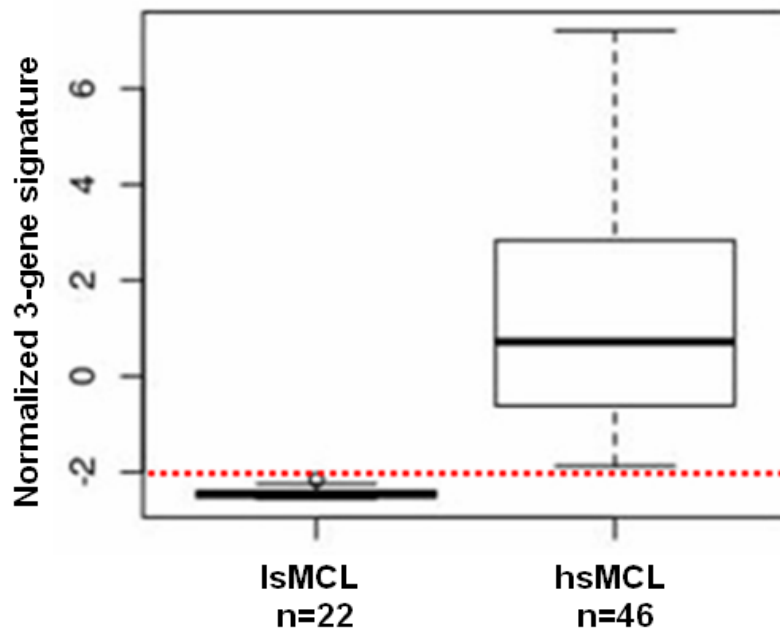


Figure S5. Secondary chromosomal alterations in MCL samples analyzed by SNP6.0 array. In the X-axis the chromosomes are represented horizontally from 1 to 22, in the Y-axis the percentage of cases showing the copy number alterations. Gains are represented in the positive Y-axis and colored in blue, whereas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

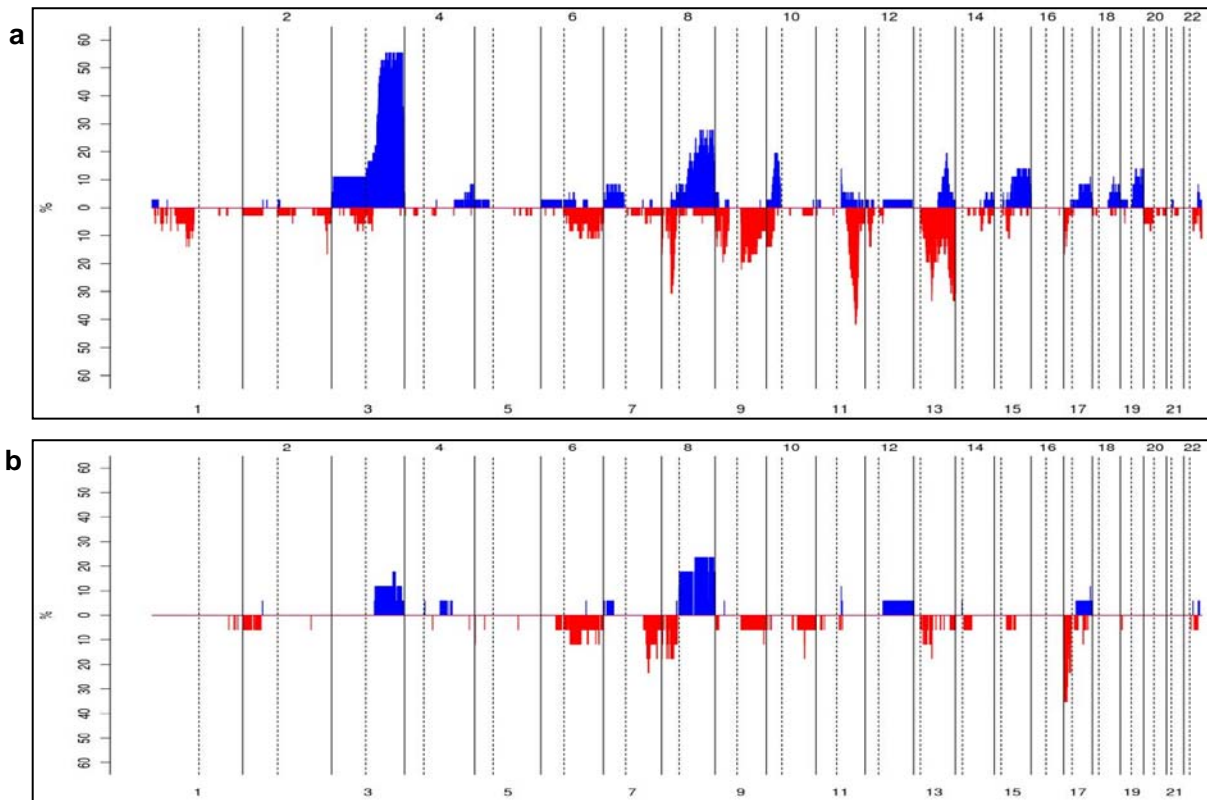
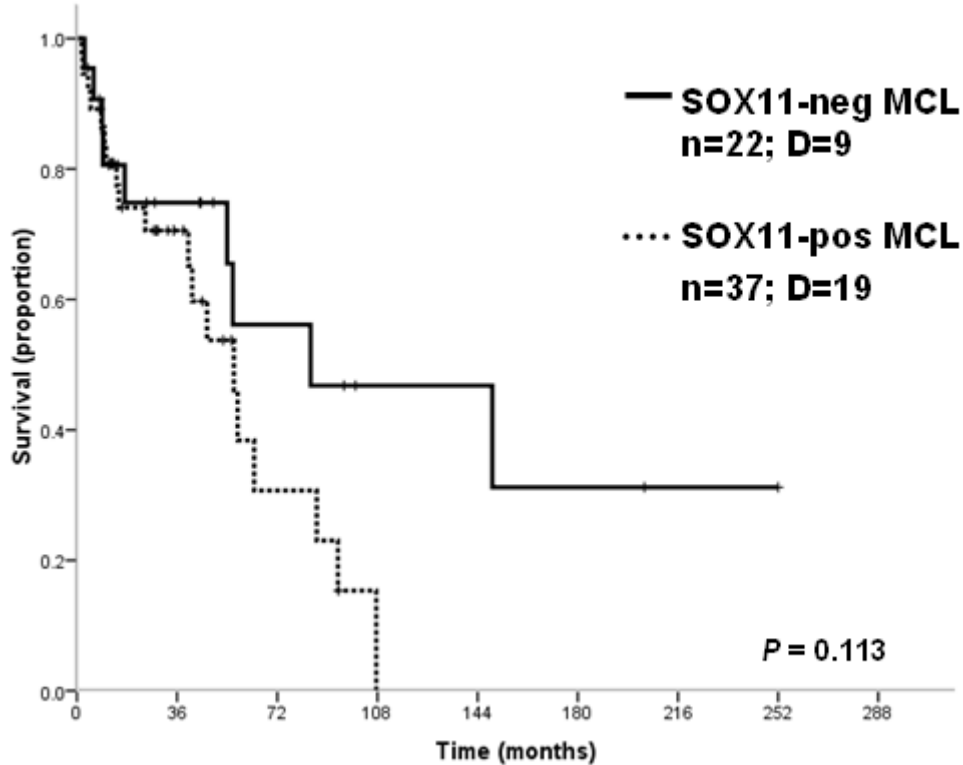


Figure S6. Kaplan-Meier estimates of overall survival for 59 MCL patients according to the high (SOX11-pos MCL, n=37) or low (SOX11-neg MCL, n=22) expression of the SOX11. The differences were not statistically significant. Using only SOX11 expression values instead of the combined 3-gene signature leads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



4. Supplementary references

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

REVISIÓN

El complejo escenario de las alteraciones genéticas del linfoma de células del manto

(Semin Cancer Biol. 21:322-34. 2011)

RESUMEN

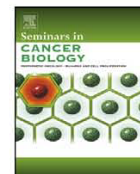
El complejo escenario de las alteraciones genéticas del linfoma de células del manto

El linfoma de células del manto (MCL) está genéticamente caracterizado por la t(11;14)(q13;q32) que desregula la ciclina D1. Se han identificado algunos casos con variantes de la translocación de *CCND1* involucrando los genes de las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas o en translocaciones alternativas implicando los genes *CCND2* y *CCND3*. Además, se han publicado casos de MCL *double-hit* con reordenamientos de *MYC* en MCL con un curso clínico muy agresivo, pero sin otras translocaciones recurrentes que ocurran de manera frecuente. En los últimos años, mediante hibridación genómica comparada y plataformas de *arrays* genómicos se ha identificado un perfil característico de múltiples ganancias y pérdidas de DNA, así como regiones de disomía uniparental que afectan a genes diana involucrados en el ciclo celular, respuesta a daño al DNA, y vías de supervivencia del MCL. Se han asociado algunas alteraciones a un peor pronóstico como son las ganancias de 3q y las pérdidas de 8p, 9p, y 17p. El número elevado de alteraciones secundarias y la morfología blastoide también se han asociado a peor pronóstico. Contrariamente, los casos con clínica indolente solamente tienen la translocación primaria t(11;14) y pocas o ninguna alteración genómica adicional. Estas observaciones sugieren que el perfil genético del MCL es un factor importante que dicta los diferentes comportamientos clínicos. Esta revisión se centra en el MCL desde una perspectiva genética y presenta la tecnología de secuenciación de nueva generación como una herramienta nueva potencial para complementar el estudio de los genomas complejos. Un mayor entendimiento de las alteraciones genéticas del MCL puede ofrecer nuevas perspectivas para unas opciones de tratamiento más adaptadas y dirigidas a cada paciente.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Seminars in Cancer Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/semcancer

Review

The complex landscape of genetic alterations in mantle cell lymphoma

Cristina Royo^a, Itziar Salaverria^a, Elena M. Hartmann^b, Andreas Rosenwald^b, Elías Campo^a, Sílvia Beà^{a,*}^a Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, University of Barcelona, Hematopathology Section, Hospital Clínic, 08036 Barcelona, Spain^b Institute of Pathology, University of Würzburg, Josef-Schneider-Str. 2, 97080 Würzburg, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:

Mantle cell lymphoma
Chromosomal translocation
Secondary genetic alteration
CGH/SNP-array
Prognosis

ABSTRACT

Mantle cell lymphoma (MCL) is genetically characterized by the t(11;14)(q13;q32) which deregulates cyclin D1. Small subsets of cases have been identified with variant *CCND1* translocations with the immunoglobulin light chain genes or with alternative translocations involving *CCND2* and *CCND3*. Additionally, double-hit MCL with *MYC* rearrangements with a highly aggressive clinical course have been reported, but no other frequent recurrent translocations have been identified. In recent years, genome-wide screening of copy number alterations by comparative genomic hybridization and genomic microarray platforms have revealed a characteristic MCL profile of multiple secondary gains and losses as well as regions of copy number neutral loss of heterozygosity that target mainly genes involved in cell cycle regulation, DNA damage response, and cell survival pathways. Several aberrations have been found to be associated with worse prognosis, 3q gains and losses of 8p, 9p, and 17p. An increased number of secondary alterations and blastoid morphology have also been shown to be associated with cases with short survival. On the contrary, indolent MCL cases carry only the primary t(11;14) and few or no other additional genomic alterations. Altogether these observations suggest that the genetic background of MCL is an important factor that dictates their different clinical behavior. This review will focus on MCL from a genetic perspective and will present next-generation sequencing technology as a new potential tool to complement the study of complex genomes. The better understanding of genetic alterations of MCL may offer new approaches for more patient-tailored, risk-adapted treatment options.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Mantle cell lymphoma (MCL) is genetically characterized by the t(11;14)(q13;q32) translocation and the overexpression of its target gene *CCND1* [1]. MCL aggressive clinical behavior is tightly related to its particular genetic and molecular pathogenesis, which integrates alterations in cell cycle regulation, DNA damage response mechanisms, and activation of cell survival pathways [2,3]. MCL is considered one of the most aggressive and incurable lymphoid neoplasias and nearly all of the patients follow a relative rapid disease evolution with limited responses to therapeutic strategies, with a reported median survival of only 3–5 years. However, in the last years, new promising drugs targeting molecular mechanisms deregulated in MCL have been developed [4]. These new perspectives raise hope that a better understanding of the genetic alterations underlying the biology of these tumors

may result in an improvement in the diagnostic and management strategies of the patients.

Several studies have shown that the main biological parameters related to an unfavorable prognosis in MCL are an increased level of proliferation [5], the “MCL international prognostic index” (MIPI) score [6] and a blastoid morphology [2,7]. High MIPI scores and high proliferation may be useful tools to discriminate patients with short survival times. However, they may not correspond to indication of treatment. Thus, these parameters are not currently used in clinical practice to adopt different risk-adapted therapeutic measures; this is, in part, due to the current understanding of MCL as a very aggressive tumor that requires an intense treatment at the moment of diagnosis, in order to overcome its poor natural history.

Some recent observations challenge this common view and the clinical management of MCL, since a subset of MCL patients (up to one third of the cases) has been recognized, with a stable disease that follow an indolent clinical course without need for immediate treatment [8–11]. The recognition of these patients at diagnosis is important because they may benefit from a less aggressive approach for some time (even observation without treatment). This may specifically affect older patients, thus avoiding both the toxicities related to treatment and the emergence of secondary malignancies [8,12]. These indolent MCL tend to present clinically with a non-nodal and leukemic disease, but the biological features

* Corresponding author at: Centre Esther Koplowitz, 2nd Floor, Office 2.5, Rosselló, 153, 08036-Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 2275400x4529; fax: +34 93 2275717.

E-mail addresses: croyo@clinic.ub.es (C. Royo), isalaver@clinic.ub.es (I. Salaverria), elena.hartmann@mail.uni-wuerzburg.de (E.M. Hartmann), rosenwald@mail.uni-wuerzburg.de (A. Rosenwald), ecampo@clinic.ub.es (E. Campo), sbea@clinic.ub.es (S. Beà).

that underlie this particular behavior are not well known. In a recent study, our group showed that indolent MCL have a global gene expression profile similar to conventional MCL, but that they differ in the expression of a small signature of genes. This “indolent MCL” signature includes the lack or low levels of *SOX11*, which is usually expressed in virtually all conventional MCL but absent in all mature lymphoid cells and in most other types of lymphoid neoplasias [13,14]. Genetically, indolent MCL show very stable genomes and no inactivation of *TP53*, *CDKN2A* and *ATM* genes, suggesting that their genetic background may be an important factor dictating their indolent clinical course [10]. All these studies have emphasized that the clinical and biological behavior of MCL is closely related to different genetic alterations targeting some specific genes, but it is also very closely related to the global genomic complexity of the tumor at the moment of its diagnosis.

In this review we will discuss the primary genomic alterations in MCL, namely cyclin D translocations, and the secondary genomic alterations (i.e. losses, gains, translocations, mutations) identified in the last years using different cytogenetic and molecular approaches, and the putative/candidate target genes of

these alterations. We will address how these alterations may be integrated in different pathogenetic pathways and finally, we will summarize the potential clinical impact of this plethora of structural variants in MCL.

2. Primary translocations in MCL

2.1. *CCND1* gene translocations

2.1.1. Conventional translocation of *CCND1* with heavy immunoglobulin (*IGH*) chain

Virtually all cases of MCL carry the t(11;14)(q13;q32) translocation, leading to the juxtaposition of the *CCND1* gene at 11q13 to the *IGH* joining region at 14q32 (Fig. 1A and D), which results in the constitutive overexpression of cyclin D1. The t(11;14) is detected in approximately 65% of the cases by conventional cytogenetics (CC), but can be identified in 99% of MCL cases by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with probes involving the *IGH* and *CCND1* regions. Interestingly, multicolor-FISH (M-FISH) or CC in

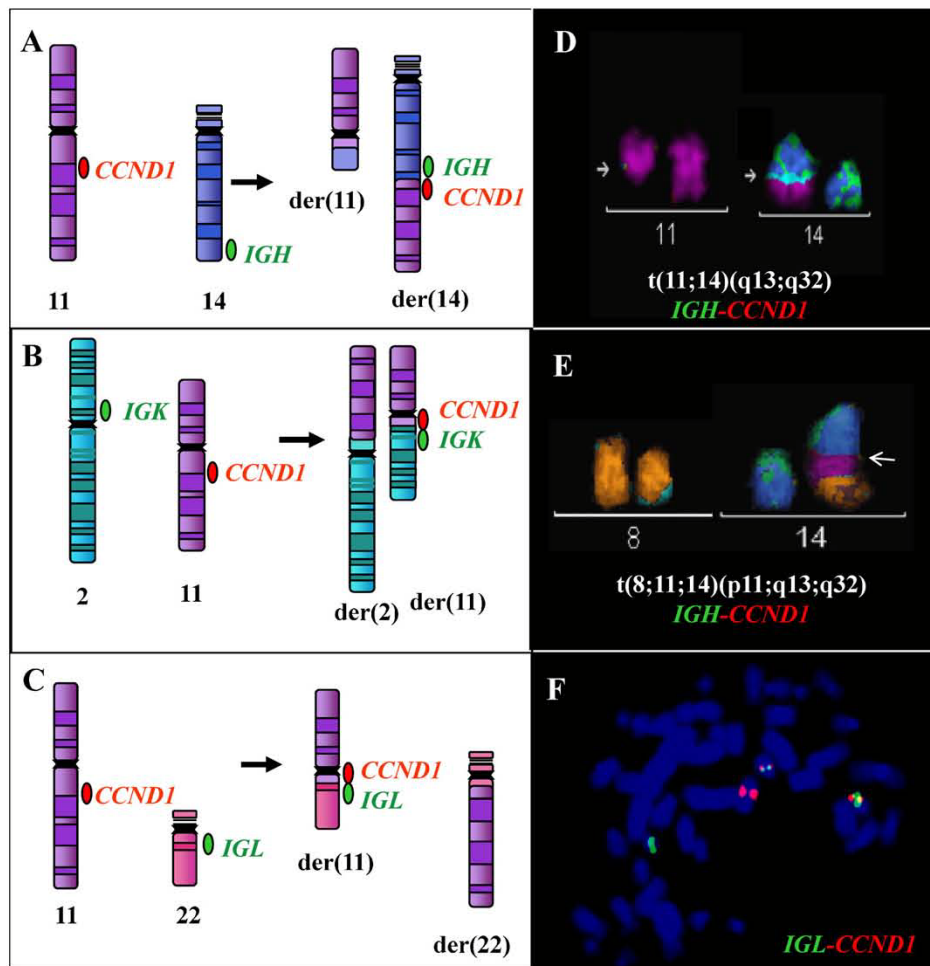


Fig. 1. Primary chromosomal translocations in MCL. (A) Schematic representation of the classic translocation of *CCND1* gene (red) with *IGH* (green). Both intact chromosomes are shown, colored dots indicate the regions analyzed by FISH. After the rearrangement, both derivative chromosomes are shown with the fusion signal (green and red colocalization) in the derivative chromosome 14; (B) variant t(2;11)(p11;q13) translocation with the *IGH* kappa light chain, the fusion signal is indicated by an arrow in the derivative chromosome 11; (C) variant t(11;22)(q13;q11) translocation with the *IGH* lambda light chain, the fusion signal is indicated by an arrow in the derivative chromosome 11; (D) t(11;14)(q13;q32) translocation detected by M-FISH technique, only pseudocolored chromosomes 11 (pink) and 14 (green) were illustrated, the fusion signal is indicated by an arrow; (E) pseudocolored M-FISH image of a complex translocation involving also chromosome 8 (orange), the fusion signal is indicated by an arrow; (F) metaphase hybridized with probes for *IGL* and *CCND1* showing the fusion signal in the derivative chromosome.

Table 1
CCND1 variant translocations in MCL.

Reference	Initial diagnosis	Age/gender	Primary translocation	Cyclin D1 expression	IGHV	Follow-up	Treatment	Status	Karyotype
Wlodarska et al. [19]	Leukemic B-cell lymphoma	71/F	IGK-CCND1	+	na	4 yr	4 yr untreated/then cytoreductive	Died	46,XX,t(2;11)(p11;q13)[7]; 46,idem,del(1)(q22q42),r(8)[2]
Wlodarska et al. [19]	Leukemic B-cell lymphoma	48/M	IGK-CCND1	+	mut	0.7 yr	Untreated	Alive	45,XY,t(2;11)(p11;q13),-2[13];46,XY[12]
Wlodarska et al. [19]	Leukemic B-cell lymphoma	69/F	IGK-CCND1	na	mut	0.7 yr	Untreated	Alive	46-47,XX,t(2;11)(p11;q13)[2]; 46,idem,add(5)(p15),add(16)(q24),i(17)(q10)[2]; 47,idem,add(5)(p15)+15,add(16)(q24),i(17)(q10)[4]
Espinet et al. [21]	MCL	50/F	IGL-CCND1	na	na	4 yr	Untreated	Alive	46,XX,t(11;22)(q13;q11)[36];46,XX[14]
Rocha et al. [22]	CLL	60/F	IGL-CCND1	+	mut	2 yr	Untreated	na	47,XX,+3,t(11;22)(q13;q11.2)[16]; 46,X,der(X)t(X;1)(p22.1;p21),del(1)(p21),+3,der(8) t(8;17)(p21;q21);t(11;22)(q13;q11.2)-17.2-9dmi[4]
Komatsu et al. [20]	MCL	72/F	IGL-CCND1	+	na	2 yr	Treatment from diagnosis	Relapsed	46,XX,del(1)(p11p22);t(11;22)(q13;q11)[10]; 46,idem,del(6)(q21q25)[14]

Abbreviations: F, female; IGHV: immunoglobulin variable heavy chain; M, male; m, month; na, not available; neg, negative; pos, positive; yr, year.

combination with FISH analyses have revealed a subset of primary tumors and cell lines with complex t(11;14) translocations involving the *IGH* and *CCND1* loci (Fig. 1A and D) and other chromosomes (Fig. 1E) [15,16], such as 3, 6, 8, 10 and 17 [16]. Although not extensively reflected in the literature, with only one single case reported [15], it is a common observation that more than 15% of the MCL cases tested for the t(11;14) by FISH display an aberrant FISH constellation pattern, including complicons of the fusion signal *IGH-CCND1* (Siebert R, personal communication and our own observations). Mechanistically, complicons imply two concomitant genomic ways of cyclin D1 deregulation, translocation and amplification, acting simultaneously on the same allele. Of note, amplification of an *IGH*-oncogene fusion has previously been reported to be associated with poor outcome and resistance to treatment in other B-cell malignancies [17,18].

2.1.2. Variant *CCND1* translocations with *IG* light chains

In follicular lymphoma (FL), diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) and Burkitt lymphoma (BL) a small proportion of cases carry variant translocations of *BCL2*, *BCL6* and *MYC* with *IG* light chains rather than *IGH*. In cases with a *MYC* break the frequency of these variant translocations is around 20%. Conversely, in MCL only six cases with variant translocations of *CCND1* with *IG* light chains have been reported (Fig. 1B, C and F and Table 1). Three cases had the t(2;11)(p11;q13) with a fusion of the *CCND1* gene with *IG* kappa light chain (*IGK*) (Fig. 1B) [19], whereas the remaining three cases had the t(11;22)(q13;q11) with *CCND1* fused to *IG* lambda light chain (*IGL*) (Fig. 1C and F) [20–22]. Similarly to other B-cell lymphomas with variant translocations in oncogenes, all evidences indicate that in MCL there is also a variation in the breakpoints affecting *CCND1* and in the *IG* light chain translocations, with the breakpoints occurring in the 3' region of *CCND1* gene [19,20]. Noteworthy, five of the six MCL cases with *IG* light chain rearrangements reported were not treated at diagnosis, which was possibly due to their misclassification as leukemic B-cell lymphoma or CLL. Only two of these patients were diagnosed as MCL; one of those was not treated and still alive after 4 years of follow-up with the variant *CCND1* translocation as a sole abnormality [21], whereas the other MCL displayed a complex karyotype and required treatment at diagnosis [20]. *IGHV* genes were mutated in the three analyzed cases, suggesting that these cases may have been originated from an antigen experienced B-cell [19], a finding usually associated in MCL with more indolent behavior.

2.2. Cyclin D1-negative MCL

Some years ago, pathologists recognized a small subset of lymphomas resembling conventional MCL both morphologically and phenotypically, but with absence of the t(11;14) and negativity for cyclin D1 expression. These observations opened the debate regarding the existence of “true” MCL negative for cyclin D1. From a clinical point of view, it became crucial to discriminate this “potential MCL” with aggressive clinical behavior from other small B-cell lymphomas with a more indolent clinical course. A gene expression study shed light on this apparent controversy, and reported for the first time a study of six cyclin D1-negative lymphoma cases with morphologic, pathologic, clinical and molecular features similar to typical MCL [23]. In the absence of cyclin D1, these cases over-expressed cyclin D2 or D3, but with no evidence of chromosomal aberrations affecting these loci.

Interestingly, subsequent studies were able to detect MCL cases with high levels of cyclin D2 due to chromosomal translocations involving *CCND2* and *IG* genes such as the t(2;12)(p11;p13) fusing the *CCND2* gene to the *IGK* locus [24], the t(12;22)(p13;q21) with the fusion *IGL-CCND2* [25], and the cryptic t(12;14)(p13;q32) fusing *IGH-CCND2* [26] (Fig. 2). Additionally, two *CCND2* translocations

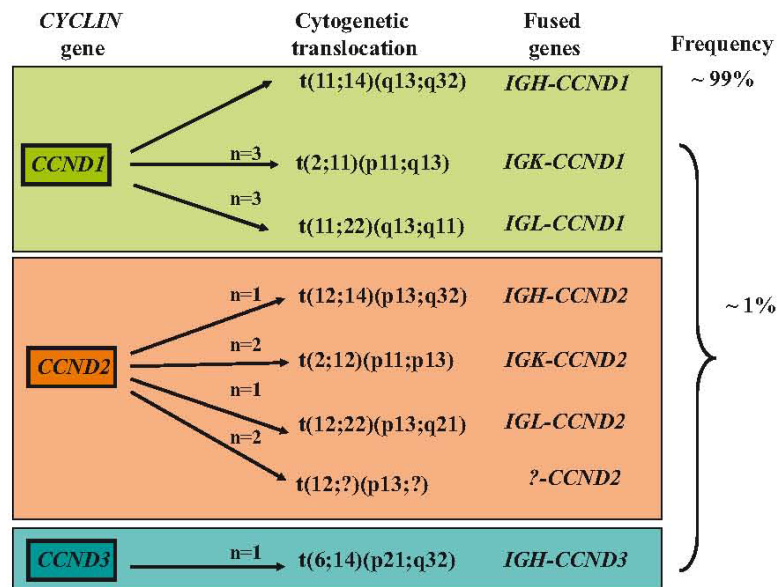


Fig. 2. Variant primary chromosomal translocations in MCL. Virtually all MCL cases have the conventional t(11;14), whereas six cases have been reported with variant translocations of *CCND1* and *IG* light chain genes, six cases with breaks in *CCND2* and one case with translocation in *CCND3*.

with an unidentified partner have also been described [14,27], both cases with high levels of cyclin D2. Only one MCL case with translocation of *IGH* with *CCND3* has been reported so far [28]. However, the use of immunohistochemical staining of cyclins D2 or D3 in the routine diagnosis may not be useful to clearly identify Cyclin D1-negative MCL, because these cyclins are also expressed in other B-cell lymphomas at lower levels and immunohistochemistry is not sensitive enough to discriminate the differences [14,27].

Interestingly, SOX11, a transcription factor expressed in 90% of MCL but which is negative in virtually all mature B and T cell lymphomas with the exception of some Burkitt lymphomas and T-prolymphocytic leukemias, has been also detected in 12 cyclin D1-negative MCL [14], demonstrating that SOX11 is a reliable and highly specific biomarker for both conventional and cyclin D1-negative MCL.

In subsequent studies using conventional comparative genomic hybridization (CGH) [29] and SNP-arrays [30] we have shown that cyclin D1-negative MCL had a similar secondary genomic alteration profile compared to conventional MCL cases, supporting the idea that cyclin D1-negative and positive MCL may be a real biological variant of MCL. However, the potential role of *CCND2* and *D3* translocations as alternative pathogenetic mechanisms to *CCND1* rearrangement is not yet clear in these tumors.

3. Secondary genomic alterations in MCL

3.1. Recurrent cytogenetic findings in MCL

Besides the above mentioned primary translocations with D-type cyclins, only very few secondary translocations have been identified in MCL patients. The most frequent is the translocation of *MYC* with *IG* genes in a similar scenario compared to the double-hit DLBCL (Table 2) [31–35]. The six cases reported so far were diagnosed as MCL with the t(11;14) and, in addition, showed a rearrangement of *MYC* with one of the *IG* chains. The extremely poor prognosis of double-hit DLBCL [36] is also paralleled in MCL with *MYC* translocations. In these six MCL, the karyotypes were complex and five of them had blastoid morphology and an extremely short survival. Other cytogenetic studies have reported blastoid MCL with

add(8q24) and extra signals of *MYC* by FISH associated with a poor prognosis [32,33,37]. In contrast to BL with the t(8;14) that have few or no other chromosomal changes, *MYC* translocations were associated with multiple secondary genomic alterations in MCL, FL and DLBCL. In these three entities the detection of a *MYC* rearrangement, either at diagnosis or at relapse, represents a strong negative prognostic factor [38].

An M-FISH study of MCL showed no recurrent translocations in addition to the t(11,14) although recurrent breakpoints at 1p22 and 8p11 were observed in the context of complex karyotypes [16]. Concordantly with this observation, a comprehensive search in the Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer (<http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>) revealed few cases with other recurrent translocations. Only two recurrent translocations were identified, namely the der(17)t(3;17)(q13;p11) and the der(16)t(11;16)(q13;q24) in three [39,40] and two cases [40,41], respectively. In none of them the potential target genes are known, but the breakpoints at 3q13 and 17p11 are relatively frequent in unbalanced rearrangements [16]. Another consistent observation in MCL karyotypes, especially in the blastoid variants, is the presence of karyotypes in the tetraploid range [21,40,41], a feature that could be possibly related to the high levels of cyclin D1 protein [42].

3.2. Low resolution metaphase CGH

The application of CGH has been instrumental to define the characteristic patterns of gains and losses of tumor genomes [43]. This technique has the advantage that it only requires tumor DNA and offers a genome-wide characterization. In this sense, the seven CGH studies reported in MCL from 1998 to 2004 revealed that MCL had a characteristic profile of genomic alterations in addition to other common aberrations also found in other lymphomas, but at much higher frequency. Interestingly, the high incidence of 11q and 13q losses was only found in MCL and chronic lymphocytic leukemia (CLL) [44], but virtually never in other B-cell lymphomas, suggesting that these two entities may share common pathogenetic mechanisms. In contrast to other B-cell lymphomas, more than 90% of the MCL cases showed at least one alteration and the

Table 2
Double-hit MCL: morphological and clinical data of MYC-translocation positive MCL.

Reference	Original case ref.	Diagnosis	Age/gender	Morphology	OS (m)	Rearrangement	Karyotype
Vaishampayan et al. [33]	Case 1	MCL	67/M	Blastoid	10	IGH-MYC	44,X,-Y,add(6)(p25),t(8;14)(q24;q32),del(9)(q12),t(11;14)(q13;q32),-2,der(19)t(1;19)(q21;p13)
Hao et al. [32]	Case 5	MCL	60/F	Blastoid classic	10	IGH-MYC	46,X,del(X)(q26),t(8;14)(q24;q32),t(11;14)(q13;q32),add(13)(q32),add(15)(q24),del(17)(p11;p13),add(18)(p11)
Thirier et al. [31]	Case report	MCL	na/M	Classic	5	IGK-MYC	45,XY,t(2;8)(p12;q24),dic(10;15)(p10;p13),der(11)t(11;14)(q13;q32),der(14)t(11;14)(q11;q14),del(11)(q14q22)/45,idem,del(6)(q715q724)
Oliveira et al. [35]	Case report	MCL	33/M	Blastoid	9	IGK-MYC	47,XY,t(2;8)(p12;q24)[21],+7[2],del(9)(q13)[2],t(11;14)(q13;q32)[2],-del(17)(p11.2)[1],46,XY[cp21]
Michaux et al. [34]	Case report	MCL	71/M	Blastoid	2	IGL-MYC	46,XY,t(11;19;14)(q13;q32),ins(12;?)?(q21;?),del(13)(q14q22),der(22)t(8;22)(q24;q11)[6]/46,idem,add(2)(p25)[3]/46,idem,add(3)(q29)[2]
Hao et al. [32]	Case 4	MCL	50/F	Blastoid pleomorphic	3	7-MYC	45,X,-X,del(1)(p13p22),-2,der(8)t(2;8)(q13;q24),del(9)(p12),t(11;14)(q13;q32),t(12;18)(q13;q23),-13,add(15)(p15),add(2)(p13),+2mar

Abbreviations: F, female; M, male; m, month; na, not available; os, overall survival; ref, reference.

total number per case was also higher than in other lymphoid neoplasias, this highlights the high extent of genomic instability in MCL genomes (Table 3) [43]. The regions most frequently affected by losses were 1p, 6q, 8p, 9p, 9q, 10p, 11q, 13q, and 17p and gains of 3q, 7p, 8q, 12q, 15q, and 18q (Table 3) [7,29,44–49]. Some of these alterations occur simultaneously (loss of 8p together with gain of 8q), whereas others seem to be alternative in most of the cases (1p loss or, alternatively, 3q gain) (unpublished observations).

In spite of the relatively low resolution of the CGH technique, the delineation of minimally altered regions has facilitated the identification of potential target genes using alternative techniques such as Southern blot, gene mutational analysis, microsatellite quantitative PCR, and FISH (Table 3). In that sense, *ATM* and *TP53* genes were mutated in most of the MCL cases with 11q and 17p losses, respectively [7,30,50,51]. Other target candidate genes validated by Southern blot are *CDKN2A* (9p21), and the genes included in high-level amplifications such as *MYC* (8q24), *BMI1* (10p13), *CDK4* (12q14), and *BCL2* (18q21). Although all CGH studies were concordant both in the high frequency and the minimal region (3q27–q29) of gain in chromosome 3, the potential target oncogenes still remain elusive. Similarly, the losses of 1p, 6q, and 13q were very frequent (20–70%) in MCL, but no clear target genes have been identified so far.

Blastoid MCL have a higher number of alterations, gains of 3q, 7p, and 12q, and losses of 9p21 and 17p compared to the classic variant [7,29]. The study of sequential samples in a few cases has demonstrated the acquisition of additional alterations in the evolution of the disease [45]. Two classic MCL with only 3q gains at diagnosis acquired losses of 9p and 17p, amplification of 8q24 and blastoid morphology at relapse. In two additional patients the relapsed sample acquired the loss of chromosome 9, 1p, Xp and gain of 8q [45].

3.3. High resolution CGH-array and SNP-array

The analysis of primary MCL with higher resolution platforms like CGH-array [52–57] and single nucleotide polymorphism (SNP) microarrays [30,58–62] combined with microarray GEP studies has been useful to identify new small altered regions and candidate genes (Table 4 and Fig. 3). These integrative studies have identified recurrent homozygous deletions with relatively few potential target genes. In addition to the well-known 9p21.3 deletion (Fig. 4A) including *CDKN2A*, *CDKN2B*, and *MTAP*, other regions with homozygous deletions are 1p33 (*FAF1*, *CDKN2C*), 2q13 (*BCL2L11*) and 2q37 (*SP100*), 19p13.1 (*TNF* superfamily genes). Monoallelic deletions also seem to target relevant genes that may contribute to the pathogenesis of the disease. In addition to the already known 17p (*TP53*) and 11q deletions (*ATM*), other monoallelically deleted regions associated with an inactivated gene in the remaining allele have been recently identified at 13q14.2 (mutation of *RB1*) [63] and 6q23.3 (mutations or hypermethylation of the promoter of the NF- κ B pathway inhibitor *TNFAIP3*) [64]. The monoallelic deletions of 1q32, 8p21.3, and 13q34 may target *PROX1*, *MCPH1*, and *ING1* and *CUL4A*, respectively, and are associated with low expression of these genes [30]. Monoallelic deletions of 6q25.1, 9p21.2 and 19p13.3 were associated with down regulation of genes of the Hippo pathway, namely *LATS1*, *MOBK2B* and *MOBK2A*, respectively.

Similarly, in addition to the well known targets *MYC*, *BMI1*, *CDK4*, *MDM2* and *BCL2*, the high resolution arrays have revealed other candidate genes of different regions with high level DNA amplifications associated with mRNA overexpression. These genes are *MIR17HG* encoding the miR-17–92 cluster at 13q31.3 [60,65], *CENTG1* at 12q14 [30] and *MAP6* and *CCND1* at 11q13 [59]. Interestingly, the amplification of the translocated 11q13 region is associated with a dramatic increase in the levels of cyclin D1 in MCL [15,60].

Table 3
Recurrent secondary genomic alterations in MCL detected by CGH and potential target genes.

	Monni et al. [44]	Beà et al. [7]	Bentz et al. [43]	Martinez-Climent et al. [45]	Allen et al. [46]	Salaverria et al. [29]	Jarosova et al. [47]	Potential target genes
Number of cases	27	45	27	28	30	77	30	
% altered cases	100	89	85	95	100	90	80	
Mean number of alterations/case	4	6	4	6	7	4	6	
Chromosomal region	% cases	% cases	% cases	% cases	% cases	% cases	% cases	Minimal region
Loss 1p	33	24	33	26	33	27	27	1p21-p22
Loss 3p	4	7	–	5	–	–	–	3p13-p14
Loss 6q	30	27	19	32	37	13	13	6q21-q22; 6q25-q26
Loss 8p	7	7	30	79	23	33	33	8p22-p21
Loss 9p	30	16	30	16	17	7	7	9p21
Loss 9q	15	13	14	5	13	20	20	9q21-q22
Loss 10p	–	18	11	10	17	17	17	10p14-p15
Loss 11q	30	22	19	26	27	28	37	11q22-q23
Loss 13q	41	40	70	32	60	33	33	13q13-q14; 13q33-q34
Loss 17p	19	16	4	26	20	30	30	17p13
Gain 3q	52	49	37	37	70	40	40	3q27-q28
Gain 7p	15	27	7	5	23	8	7	7p22
Gain 7q	7	9	4	–	27	4	3	7q11-q21
Gain 8q	30	21	19	32	10	23	23	8q24
Gain 10p	7	9	4	5	13	7	7	10p12-p13
Gain 12q	11	20	19	5	30	10	10	12q13-q14
Gain 13q	7	16	–	5	3	17	17	13q31-q32
Gain 15q	26	11	4	16	23	13	13	15q22-q24
Gain 18q	7	18	26	10	7	7	7	18q21-q22

Abbreviations: CGH, comparative genomic hybridization; MCL, mantle cell lymphoma. Only alterations with frequencies >5% are indicated. Minimal region was delimited considering all publications. Potential target genes were only indicated if they were validated by other molecular or cytogenetic techniques and if they were reported in two or more studies.

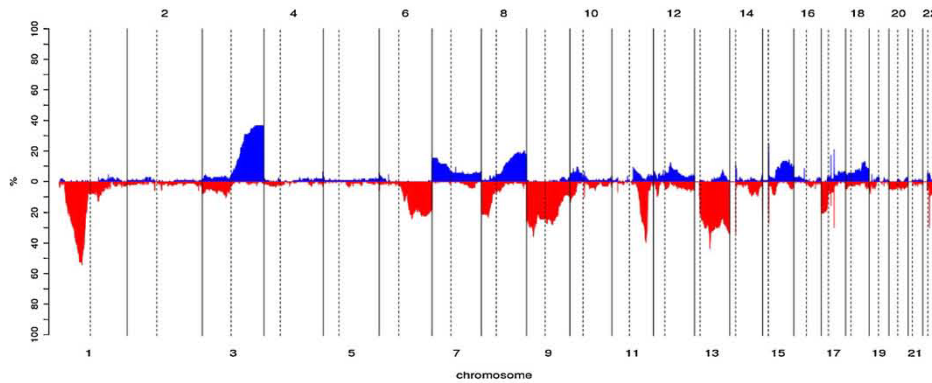


Fig. 3. Secondary chromosomal alterations in primary MCL. Frequency plot of two series of MCL analyzed by 100K-SNP array ($n=28$ cases) and 500K-SNP array ($n=77$). In the X-axis the chromosomes are represented horizontally from 1 to 22, in the Y-axis the percentage of cases showing the copy number alterations. Gains are represented in the positive Y-axis and colored in blue, whereas losses are represented in the negative Y-axis in red.

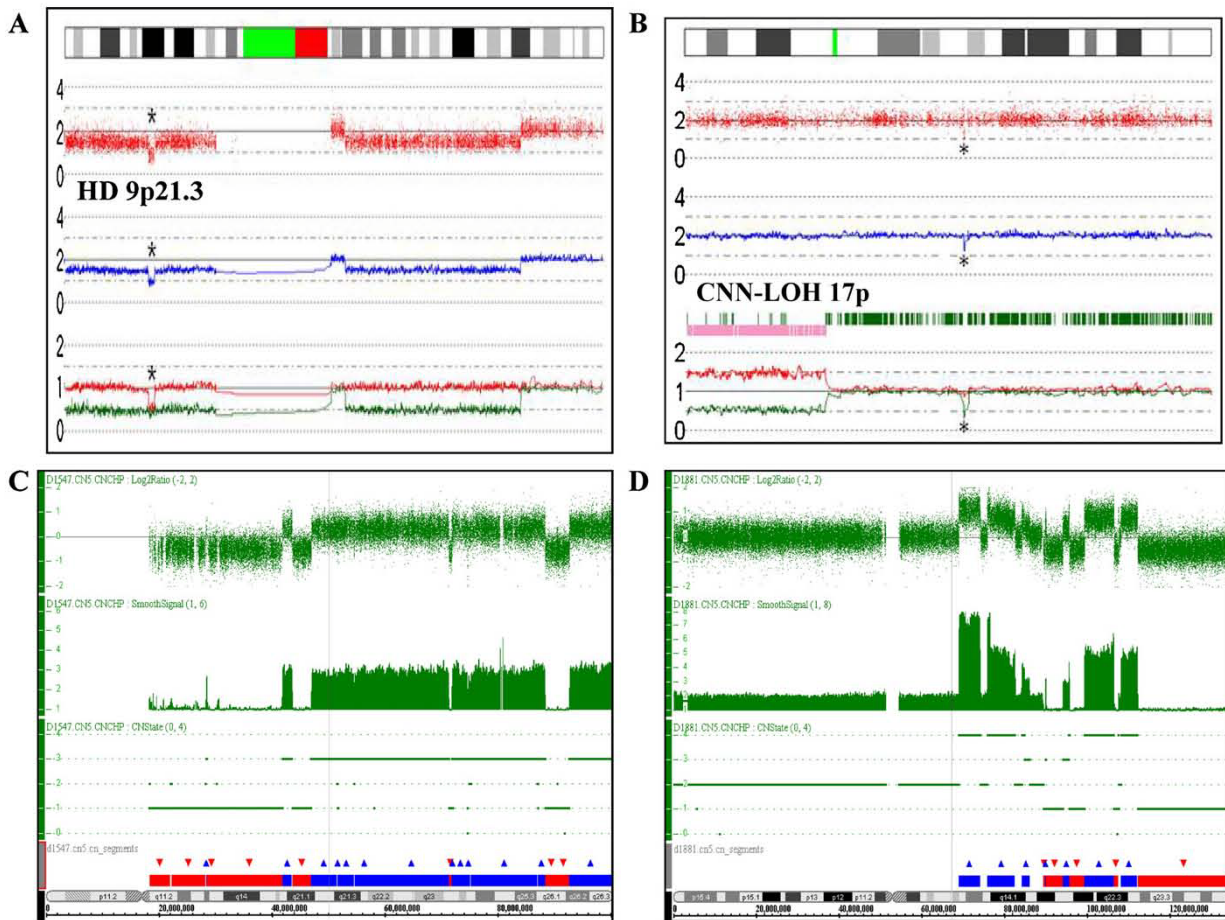


Fig. 4. Examples of individual altered chromosomes in MCL by two different SNP-array platforms. (A) Losses in chromosome 9 detected by 500K-SNP array, the image was generated with CNAG and AsCNAR. The red dots (top panel) show individual SNP probe signals, the blue line (second panel) represents total gene dosage. The diploid state is indicated by 2. Chromosome 9 shows loss of 9p arm with a homozygous deletion (HD) of *CDKN2A* (asterisk) and a large interstitial loss in the q arm. The red and green lines (third panel) indicate allele-specific gene dosage levels, with loss of 9p and partial 9q of one parental chromosome and focal loss of *CDKN2A* in the other parental chromosome; (B) 17p CNN-LOH detected by 500K-SNP array. Chromosome 17 shows no copy number alterations except one small deletion in a common CNV locus in 17q21.31 (asterisk). The third panel indicates the heterozygous SNP calls (in green), which are mostly lost in 17p. The red and green lines (fourth panel) indicate allele-specific gene dosage levels, with loss of one parental 17p region and gain of the remaining parental region; (C) Highly rearranged chromosome 15. Data is generated by SNP6.0 arrays using the GTC-CN4 algorithm. In every panel, from top to bottom the charts display: 1) log₂ ratio 2) smooth signal of copy number; 3) segmented copy number state: 2 indicates diploid, 3 indicates gain, 4 or more indicates amplification, 1 indicates loss; 4) schematic display of gains (blue) and losses (red); 5) chromosome with cytobands. The chromosome 15 of this MCL patient shows a patched pattern of losses alternated with gains with not a single region with diploid dosage; (D) chromosome 11 in another MCL case, that shows no alterations of 11p arm, while the q arm is highly altered: amplification of 11q13 (*CCND1* locus), several other amplifications, three interstitial losses and a large terminal 11q loss (including *ATM* gene).

Table 4
Recurrent minimal regions and target genes detected in MCL by CGH- and SNP-arrays.

Loss/homozygous loss	SNPa (range %)	CGHa (range %)	Candidate genes	Pathways
Loss 1p21.2	17–55	29–50		
Loss 1p22.2–p22.3	13–55	29–50		
Loss 1p32.3–p33 ^a	4–14	–	<i>CDKN2C, FAF1</i>	Cell cycle/cell survival
Loss 1q32	5–18	–	<i>PROX1</i>	Proliferation
Loss 2q13 ^a	3–4	17	<i>BCL2L1</i>	Cell survival
Loss 2q37.1	15–33	–	<i>SP100, SP140</i>	DNA damage
Loss 6q23.3	19–23	26–36	<i>TNFAIP3</i>	NF- κ B inhibitor
Loss 6q25	19–28	23–36	<i>LATS1</i>	Hippo signaling pathway
Loss 8p21.3	25–31	17–34	<i>MCPH1</i>	DNA damage
Loss 9p21.2	19–24	10–36	<i>MOBK2B</i>	Hippo signaling pathway
Loss 9p21.3 ^a	10–36	10–36	<i>CDKN2A/B, MTAP</i>	Cell cycle
Loss 9q22.2–q22.31	17–29	18–31		
Loss 10p14–p13	18–27	18–28		
Loss 11q22.3	11–55	21–57	<i>ATM</i>	DNA damage response
Loss 13q12.3–q13.1	15–27	43–54		
Loss 13q14.2	27–38	25–55	<i>RB1</i>	Cell cycle
Loss 13q33.2–q33.3	35–36	28–54		
Loss 13q34	16–39	28–54	<i>CUL4A, ING1</i>	Cell cycle/DNA damage
Loss 17p13	10–32	22–45	<i>TP53</i>	Cell cycle, DNA damage
Loss 19p13.1	3–19	24		
Loss 19p13.3	10–19	24	<i>MOBK2A</i>	Hippo signaling pathway
Loss 21q11.2	10–19	–		
Gain 3q26.1–q26.32	28–46	31–50		
Gain 7p22.1–p22.3	8–19	16–31		
Gain 8q24.21	6–32	17–19	<i>MYC</i>	Proliferation
Gain 10p12.2–12.31	6–7	12	<i>BMI1</i>	Cell cycle
Gain 11q13.3–q21	4–14	9–11	<i>CCND1, MAP6</i>	Cell cycle/microtubule dynamics
Gain 12q14	4–7	3	<i>CDK4, MDM2, CENTG1</i>	Cell cycle/apoptosis/DNA damage
Gain 13q31.3	6–11	5	<i>MIR17HG (miR-17-92)</i>	Cell cycle, apoptosis
Gain 15q23	10–23	9		
Gain 18q21.33	3–11	5–17	<i>BCL2</i>	Apoptosis

Abbreviations: CGHa, comparative genomic hybridization array; MCL, mantle cell lymphoma; SNPa, single nucleotide polymorphism array.

Potential target genes were only indicated if they were validated by other techniques and if there is previous evidence of oncogenic or tumor suppressor activity.

^a Homozygous loss reported.

The information derived from the study of MCL genomes with microarrays has been also useful to understand different patterns of chromosomal instability and generation of secondary rearrangements in these tumors. In that sense, the use of high density DNA arrays (i.e. SNP6.0 from Affymetrix) has provided some clues regarding alterations generated through multiple rounds of breakage-fusion-bridge (BFB) cycles [66] or multiple rearrangements generated from a single catastrophic event (chromotrypsis), a phenomenon recently described using next generation sequencing (NGS) technologies in 2–3% of all cancers [67]. Chromotrypsis usually affects a single chromosome or a chromosomal arm, and it is characterized by tens to hundreds of genomic rearrangements that have been acquired in a single catastrophic event, the copy number usually oscillates between 1 and 2, with rearrangements of all four possible orientations and also complex interchromosomal rearrangements [67]. In MCL, several chromosomes show features of this phenomenon even with more complex patterns, oscillating from loss to gain all along a single chromosome and without a single region with diploid dosage (Fig. 4C). Moreover, some MCL cases, mainly of the blastoid variant, show a high number of high-level DNA amplifications. CGH or low resolution CGH arrays were only able to discern one peak of amplification in certain regions. However, the high density of probes in the newest arrays is capable of determining complex patterns of amplified regions, alternated with diploid or lost regions, suggesting that they have been originated from repetitive iteration of BFB cycles. These cycles are initiated by a telomere loss that generates naked and sticky chromosome ends, which tend to fuse with each other, forming anaphase bridges and aberrant repair. This process may be repeated in several cell divisions with the creation of different breaks in each cycle. This iterative process may progressively increase the genomic instability leading to amplifications and losses of regions containing oncogenes and tumor suppressor genes, respectively.

Fig. 4D shows an example of 11q instability (both examples are unpublished observations of the authors).

3.4. Genes and pathways targeted by recurrent secondary alterations

The analysis of the genes included in the multiple aberrant chromosomal regions in MCL indicates that these alterations are targeting genes functioning in similar pathways, suggesting that their disruption may be important for the pathogenesis of these tumors. These pathways include cell cycle regulation, DNA damage and repair, cell survival, the Hippo signaling pathway and microtubule-associated proteins (Table 4).

(i) *Cell cycle*: The t(11;14) targeting cyclin D1 is pivotal in the cell cycle deregulation, and is frequently accompanied by alterations in the *INK4A/CDK4/RB1* and *ARF/MDM2/TP53* pathways. The *CDKN2A* locus is frequently lost and this locus encodes two essential cell cycle regulatory elements, *INK4A*, a CDK inhibitor and *ARF*, a positive p53 regulator. *CDK4* is amplified/overexpressed in some highly proliferative blastoid variants [68]. Additionally, the amplification/overexpression of the Polycomb gene *BMI1*, a transcriptional repressor of *CDKN2A*, may constitute an alternative mechanism to inactivate this pathway. Two other CDK inhibitors, *CDKN2B (P15)* and *CDKN2C (P18)* have also been found silenced by biallelic deletions. Inactivating mutations of *RB1* have been described in a few cases [63]. MCL patients have also frequent losses of a larger chromosomal region encompassing *CUL4A*, which is implicated in the epigenetic activation of the *CDKN2A* locus [30,69]. Blastoid MCL have frequently inactivating mutations of *TP53*, or,

- alternatively, inactivation of p53 by *ARF* deletion [70], amplification/overexpression of *MDM2* [68] or deletion of *ING1* [30].
- (ii) DNA damage response pathway: MCL show a strikingly high number of chromosomal aberrations pointing to the perturbation of the DNA damage response machinery [2,3]. In that sense, the *ATM* gene, a regulator chromosomal instability, is frequently deleted and mutated in MCL, an event that is associated with cases with high number of alterations [16,29,50]. *CHK1* and *CHK2*, which are downstream targets of *ATM*, are also occasionally deregulated in MCL [71,72]. Recently, *MCPH1* has also been suggested as a potential target in cases with 8p23 loss [30].
- (iii) Cell survival pathways: MCL show disruption of apoptosis and cell survival pathways mainly by amplifications/overexpression of *BCL2* and homozygous deletions of the proapoptotic gene *BCL2L11* (*BIM*) [30]. Some NF- κ B pathway inhibitors are targeted by biallelic deletions (*FAF1*) [30] or inactivating alterations (deletion, mutation or hypermethylation) of *TNFAIP3* (*A20*) [30,64].
- (iv) Hippo signaling pathway: This pathway is important in cell proliferation and cancer development [30]. Approximately 40% of MCL have deletions and down regulation of four members (*MOBK2B*, *MOBK2A*, *LATS1* and *LATS2*), which were found to be associated with high proliferation, high genomic complexity, and shorter survival [30].
- (v) Microtubule-associated proteins (MAPSs): A small proportion of MCL show *MAP6* amplification and *MAP2* deletion or partial methylation suggesting that alterations in microtubule dynamics may contribute to chromosomal instability [59].

3.5. Regions of copy number neutral loss of heterozygosity (CNN-LOH)

One of the major advantages of SNP-arrays is that it allows the detection of stretches of homozygosity in the genome, allowing the assessment of regions with CNN-LOH. A region of CNN-LOH may result in a duplication of an activating somatic mutation (i.e. activating *JAK2* mutation) [73]. Alternatively, and more frequent in MCL, CNN-LOH may represent an alternative mechanism to chromosomal deletions for the inactivation of tumor suppressor genes [74], by leading to homozygosity for a pre-existing monoallelic inactivating gene alteration (e.g. mutation or methylation). These data suggest that the mutation/alteration event precedes the mitotic recombination process, which at the end leads to the removal of the wild-type allele.

As reviewed in Table 5, seven SNP-array studies in MCL have demonstrated that CNN-LOH is a frequent phenomenon, with frequencies ranging from 27% to 61% of the cases, and one to five CNN-LOH per case. The recurrent CNN-LOH found in MCL are located in 6p, 9p, 9q, 11q, 17p, 19p and 20q [10,30,59–62]. Interestingly, CNN-LOH in MCL occurs consistently in regions otherwise affected by chromosomal loss in MCL, except 6p region, that was not lost in MCL or other lymphoid neoplasias. Of note, 6p CNN-LOH was found to be the most frequent CNN-LOH (25/185, 14%) in a series of FL [75]. The most frequent CNN-LOH are 11q, 17p and 20q. Most regions of CNN-LOH involve only parts of a chromosome, indicating their emergence from one or multiple mitotic recombination events. In contrast, CNN-LOH of complete chromosomes that would be generated in a mitotic non-disjunction event, occur only occasionally in MCL (i.e. CNN-LOH of whole chromosomes 9 and 13) [30].

The target genes of the CNN-LOH in MCL are still largely unknown. The most clear example is the mutation of *TP53* gene that has been detected in six cases with 17p CNN-LOH in three different studies [30,59,60] (Fig. 4B). In the largest series of MCL analyzed by SNP-arrays so far [30], five small areas of homozygous

Table 5
Recurrent regions of CNN-LOH in MCL.

Reference	SNP array platform	N MCL cases	N cell lines	Incidence CNN-LOH	Mean CNN-LOH/case (range)	6p CNN-LOH (%)	9p CNN-LOH (%)	9q CNN-LOH (%)	11q CNN-LOH (%)	17p CNN-LOH (%)	19p CNN-LOH (%)	20q CNN-LOH (%)	Other recurrent CNN-LOH regions
Rinaldi et al. [57]	10K	22	4	6/22 (27%)	0.5 (0–1)	–	–	–	–	–	–	–	2p (18%); 11p (27%)
Vater et al. [58]	100K	26	5	na	1.6 (0–5)	8	–	–	11	4 (one case)	–	–	13q (8%); 21q (8%)
Bea et al., Fernandez et al. [10,59]	100K	28	10	13/28 (46%)	0.8 (0–5)	–	–	–	–	11	–	11	5p (7%); 16q (7%)
Kawamata et al. [60]	250K	28	5	na	0.6 ^a	–	4 (one case)	7	4 (one case)	11	4 (one case)	–	1p (7%)
Halldórsdóttir et al. [61]	250K	31	0	19/31 (61%)	2.8 (0–9)	–	–	–	–	–	6	–	12q24 (6%); 22q (6%)
Hartmann et al. [30]	500K	77	0	27/77 (35%)	0.6 (0–5)	6	4	6	5	6	1 (one case)	3	–

Abbreviations: CNN-LOH, copy number neutral loss of heterozygosity; MCL, mantle cell lymphoma; N, number; na, not available; SNP, single nucleotide polymorphism.

^a The mean number of CNN-LOH includes primary cases and cell lines in the data reported thus it was not possible to calculate them separately. The range of CNN-LOH/case was also not reported.

Table 6
Recurrent genomic alterations with prognostic significance in MCL.

Reference	Technique	Gain 3q	Loss 8p	Loss 9p ^a	Loss 9q	Gain 12q	Loss 13q	Loss 17p ^b
Katzenberger et al. [75]	Cytogenetics/FISH	–	–	9p21	–	–	13q14, 13qter	–
Espinet et al. [21]	Cytogenetics/FISH	3q	–	–	–	–	13q	17p13
Parry-Jones et al. [76]	Cytogenetics/FISH	–	–	–	–	–	13q14 13q	–
Beà et al. [7]	CGH	3q27–q29	–	9p	–	12q	–	–
Martinez-Climent et al. [45]	CGH	–	8p	–	–	–	–	–
Allen et al. [46]	CGH	–	–	–	–	–	–	17p
Salaverria et al. [29]	CGH	3q27–qter	8p21–pter	9p21–pter	9q21–q32	–	–	–
Flordal et al. [56]	aCGH	3q	–	–	–	–	–	–
Kohlhammer et al. [51]	aCGH	–	8p21	–	–	–	13q14	–
Rubio-Moscardo et al. [52]	aCGH	–	–	9p21.3	9q21–q22	–	–	17p13.1
Hartmann et al. [30]	SNPa	–	–	9p 9p21.3	–	12q14	–	–

Abbreviations: CGH, comparative genomic hybridization; aCGH, array CGH; SNPa, single nucleotide polymorphism array.

^a The target gene is *CDKN2A* (deletion/homozygous deletion).

^b The target gene is *TP53* (mutation/inactivation).

deletion embedded in large CNN-LOH regions have been found, indicating a somatic recombination event following a single copy deletion. These regions were 1p33–1p32 (*CDKN2C* and *FAF1*), 11q13.3, 13q13.3 (*C13orf36*, *RFXAP* and *SMAD9*) and two cases with 9p (*CDKN2A* and *MTAP*) (own unpublished results). However, Kawamata *et al.* [61] did not detect *CDKN2A* deletions in the four samples with 9p CNN-LOH. They had detected previously *CDKN2A* deletions in pediatric acute lymphoblastic leukemias (ALL) with 9p CNN-LOH, but rarely in cases with CNN-LOH of the whole chromosome [76]. On the other hand, a homozygous deletion of *TNFSF9/7/14* has been detected in a MCL with 19p13 CNN-LOH.

4. Prognostic significance of genomic alterations in MCL

Several studies have analyzed the prognostic impact of genomic alterations in MCL. The presence of four or more chromosomal gains [7,53] and a high number of chromosomal imbalances confer a poor prognosis to the patients [29,47,77]. This association was also maintained when the analysis was performed excluding the blastoid MCL, suggesting that the prognostic value of the chromosomal complexity could be independent of the proliferation [7]. Additionally, several recurrently altered regions have been related with shorter survival times, most of which were already described in the initial CGH studies (Table 6). In that sense, only two gains have been found to correlate with unfavorable outcome, the gain of 3q27–q29 [7,21,29,57] and the 12q gain [7,30]. On the contrary, several losses have been recurrently associated with inferior prognosis: the more frequent is the loss of 9p21 [7,29,30,53], with a high proportion of homozygous deletions, loss of 17p13 [21,47,53], loss of 8p21 [29,46,52], loss of 13q14 [21,52,77,78] and losses involving 9q21–q22 [29,53]. In a multivariate analysis, deletion of 9q21–q22 has been found to be the strongest predictor for inferior survival [53], whereas it provided prognostic information independent of the proliferation in another study [29]. The target gene of 9p21 loss is *CDKN2A*, with mono- or bi-allelic deletion and no other type of gene inactivation (methylation or mutation). Interestingly, cases with deletion of either one or both alleles have an indistinguishable inferior prognosis compared to cases without 9p loss (unpublished observations). The target gene of 17p loss/CNN-LOH is *TP53*, with deletion and mutations of the remaining allele [7] or biallelic inactivation of the gene in the cases with CNN-LOH [30,59,60]. Moreover, the prognostic impact of 17p losses in MCL is not yet clear, whereas it is associated with blastoid variants in some studies [7], it is not in others [53]. Cases with 17p loss are usually associated with complex karyotypes and in some studies with worse survival [21,21,53]. On the other hand, *TP53* mutations in MCL have been associated with worse clinical outcome [51]. Very recently, the results of the largest series of MCL assessed for 17p deletion and *TP53* mutation confirm the association of *TP53* non-silent mutations with poor clinical

outcome, whereas 17p deletions apparently did not have prognostic significance [79]. In this study, the frequency of *TP53* mutations was 14%, while the incidence of 17p losses was 32%, with only half of the cases with 17p having a mutation in the remaining allele [79], in contrast with CLL in which a large percentage (60–70%) of the cases have 17p deletion and concomitant *TP53* mutation [80]. As mentioned in Section 3.5, a small subset of MCL have CNN-LOH of the whole 17p arm and *TP53* mutations, which may explain, in part, the dissociation of 17p deletion and *TP53* mutations and its prognostic relevance in some MCL series. Nevertheless, the largest recent study mentioned assessed only the 17p losses by quantitative PCR, thus cases with CNN-LOH of 17p were not detected.

Both *CDKN2A* and *TP53* inactivation are more frequently found in blastoid and progressed/relapsed cases and are associated with high proliferation rates of the tumor cells. Interestingly, 11q deletions/*ATM* mutations occur both in classical and blastoid variants and are associated neither with proliferation nor with prognosis, possibly indicating that this alteration may occur as an initial event in MCL lymphomagenesis.

On the other end of the spectrum, the indolent MCL cases have very simple karyotypes with the t(11;14) as the sole alteration or associated with isolated additional aberrations [10,81,82] that include two cases with a small non-overlapping 3p loss [10,82] and one case with a 17p loss [10]. Interestingly, the karyotype of another case that could only be assessed 105 months after diagnosis was very complex with more than 12 alterations (including 17p loss) and 5 marker chromosomes [11]. Additionally, indolent MCL do not have inactivation of *CDKN2A*, *ATM*, or *TP53* genes, not even the case with reported 17p loss [10]. This lack of genomic alterations and molecular inactivation of crucial genes may be a possible explanation for such an indolent clinical behavior.

All these genetic data support the idea that the analysis of the genomic complexity or at least the 9p21 and *TP53* mutations may be clinically useful in the management of MCL patients.

5. Opportunities from NGS in MCL

As highlighted in this review, the use of high resolution arrays has provided a fine mapping of genome-wide copy number changes in MCL, which allowed the identification of important genes for its pathogenesis. However, in spite of this increasing knowledge, the number of genes targeted by somatic mutations is intriguingly still very limited in MCL. Only recurrent mutations of the tumor suppressor genes *TP53* and *ATM* have been found in 7–20% and 20–33% of the cases, respectively [50,51,83,84] and in *CHK2* in anecdotal cases [71,85]. Moreover, no recurrent dominant mutations in oncogenes have been apparently described. Similarly, our knowledge of potential genomic rearrangements in addition to the *CCND1* translocation in MCL genomes is still very rudimentary and

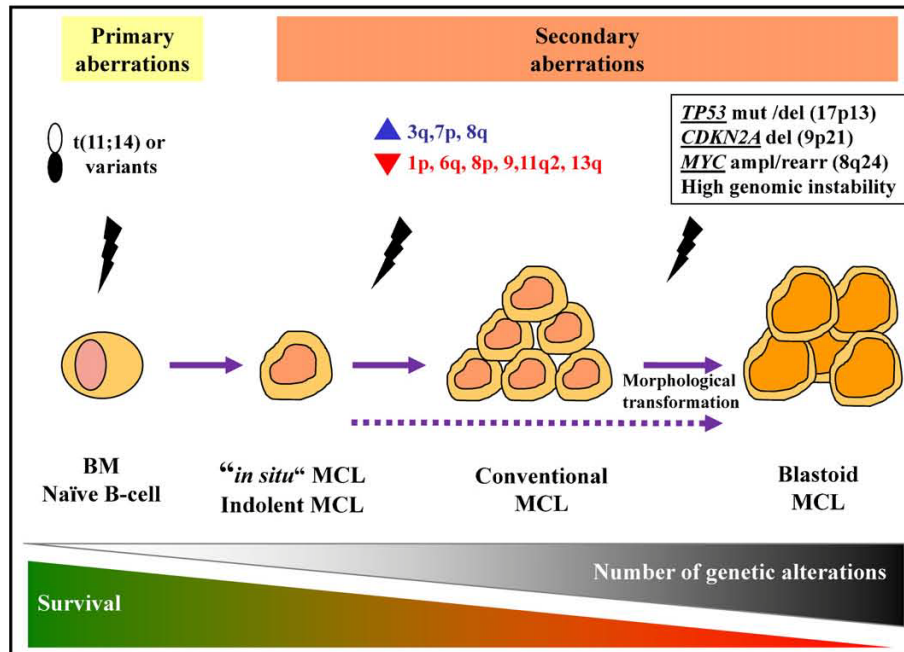


Fig. 5. Model of MCL pathogenesis in relation to genomic alterations. Stepwise progression of MCL from the moment of the initial oncogenic hit to the clinically relevant disease. Genomic losses are indicated with by a red triangle and genomic gains by a blue triangle.

has only been addressed by low resolution CC and multicolor-FISH [16,21] that depend on cell culture and study of metaphases. The lack of information on all these oncogenic aspects in MCL probably reflects the limitations in the technological strategies used so far. This point of view is supported by the recent description of recurrent somatic mutations and new gene rearrangements in lymphoid neoplasias using new powerful approaches such as the NGS. The complete sequencing of a cancer genome and its paired normal genome allows the identification of the full catalogue of novel genomic alterations that were somatically acquired, facilitating the identification of the whole range of cancer acquired alterations, from subtle point mutations to structural alterations with impact on protein function (chromosomal translocations with gene deregulation or generation of fusion genes) to local copy number alterations (gains and losses). An alternative and lower-cost approach is the sequencing of the whole exome (~1% of the whole genome) that includes protein-coding and regulatory regions.

Recently, NGS in lymphoid neoplasms has revealed mutations of *EZH2* in FL and DLBCL [86], whereas inactivating mutations of the acetyltransferases *CREBBP* and *EP300* mutations have been observed in FL, DLBCL, and B-cell acute lymphoblastic leukemia [87,88], *KRAS* and *WT1* in acute promyelocytic leukemia [89], and *BRAF* in hairy cell leukemias [90]. Interestingly, new translocations involving *CIT1A* have been identified in primary mediastinal large cell lymphoma and Hodgkin lymphoma [91] indicating the power of these technologies to discover new oncogenic alterations in cancer. The sequencing of the whole genome of four CLL has led to the identification of four recurrent mutations (*NOTCH1*, *MYD88*, *XPO1*, and *KLHL6*) associated with specific clinical and biological features of the patients [92]. Additionally, another study of the whole exome in 5 CLL cases reported recurrent mutations (*NOTCH1*, *TGM7*, *BIRC5*, *PLEKHG5*, and *TP53*) [93]. Both studies found *NOTCH1* mutations in clinically aggressive cases. Overall, these analyses indicate that the expected number of somatic mutations per lymphoma genome

is between five and 15. These recent data highlight the benefits that could be derived from the study of the complex MCL genomes with NGS technologies, both in the mutational and in the structural variant analysis.

The comprehensive processing of this information and integration with data from genotyping analysis will result in the creation of a catalogue of structural alterations affecting MCL, potentially allowing the identification of recurrent structural alterations leading to the progression of this disease and offering new diagnostic approaches orienting the treatment of the patients.

6. Conclusions/summary and perspectives

We have briefly illustrated that in the pathogenesis of MCL the sequential acquisition of secondary genomic alterations are tightly related with clinical progression and shorter survival times (Fig. 5). First, an initially healthy B-cell acquires the t(11;14) translocation (or its variants). Interestingly, this initial event may have a long latency period, since it has been described at very low levels in the peripheral blood of healthy individuals [94]. Second, by unknown mechanisms, the cells start a clonal proliferation and give rise to subtle "in situ" MCL or to indolent leukemic MCL, that show a morphology and phenotype similar to conventional MCL, but with an indolent clinical outcome. At this stage, the cells still maintain their genomic integrity. Third, some cells may acquire secondary aberrations, mainly gains and losses that target important genes that deregulate crucial cellular pathways giving rise to the development of more malignant clones that will lead to the overt conventional MCL with its characteristic clinical aggressiveness. This acquisition of alterations and also gene mutations is coupled with inferior prognosis of the patients. In a final step, the fully malignant clone could even acquire more additional alterations that include alteration of 8q24, 9p21 and 17p13, activating *MYC*, and inactivating *CDKN2A* and *TP53* genes, respectively. These additional aberrations

may contribute to an even increased genomic instability and higher levels of proliferation which may drive the rapid disease progression and, in a subset of case, a morphological transformation to a blastoid variant.

Conflict of interest

The authors state that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

This study was supported by the “Instituto de Salud Carlos III, Fondo Investigaciones Sanitarias” (FIS06/0150 and PI08/0077) (S.B.), “Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología Española” (CICYT) (SAF08/3630) (E.C.), and Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC) (RD06/0020/0039) Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Spanish Ministry of Science and Innovation & European Regional Development Fund (ERDF), Instituto de Salud Carlos III “Beca predoctoral de formación en investigación en salud” (FI08/00437) (C.R.).

References

- [1] Swerdlow S, Campo E, Harris N, Jaffe E, Pileri S, Stein H, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC; 2008.
- [2] Jares P, Colomer D, Campo E. Genetic and molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: perspectives for new targeted therapeutics. *Nat Rev Cancer* 2007;7:750–62.
- [3] Jares P, Campo E. Advances in the understanding of mantle cell lymphoma. *Br J Haematol* 2008;142:149–65.
- [4] Perez-Galan P, Dreyling M, Wiestner A. Mantle cell lymphoma: biology, pathogenesis, and the molecular basis of treatment in the genomic era. *Blood* 2011;117:26–38.
- [5] Rosenwald A, Wright G, Wiestner A, Chan WC, Connors JM, Campo E, et al. The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma. *Cancer Cell* 2003;3:185–97.
- [6] Hoster E, Dreyling M, Klapper W, Gisselbrecht C, Van HA, Kluijn-Nelemans HC, et al. A new prognostic index (MIPI) for patients with advanced-stage mantle cell lymphoma. *Blood* 2008;111:558–65.
- [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] Martin P, Chadburn A, Christos P, Weil K, Furman RR, Ruan J, et al. Outcome of deferred initial therapy in mantle-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2009;27:1209–13.
- [9] 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.
- [10] Fernandez V, Salameo O, Espinet B, Sole F, Royo C, Navarro A, et al. Genomic and gene expression profiling defines indolent forms of mantle cell lymphoma. *Cancer Res* 2010;70:1408–18.
- [11] Ondrejka SL, Lai R, Kumar N, Smith SD, Hsi ED. Indolent mantle cell leukemia: clinicopathologic variant characterized by isolated lymphocytosis, interstitial bone marrow involvement, kappa light chain restriction, and good prognosis. *Haematologica* 2011;96:1121–7.
- [12] Eve HE, Furtado MV, Hamon MD, Rule SA. Time to treatment does not influence overall survival in newly diagnosed mantle-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2009;27:e189–90.
- [13] Ek S, Dictor M, Jerkeman M, Jirstrom K, Borrebaeck CA. Nuclear expression of the non B-cell lineage Sox11 transcription factor identifies mantle cell lymphoma. *Blood* 2008;111:800–5.
- [14] Mozos A, Royo C, Hartmann E, De JD, Baro C, Valera A, et al. SOX11 expression is highly specific for mantle cell lymphoma and identifies the cyclin D1-negative subtype. *Haematologica* 2009;94:1555–62.
- [15] Gruszka-Westwood AM, Atkinson S, Summersgill BM, Shipley J, Elneaei MO, Jain P, et al. Unusual case of leukemic mantle cell lymphoma with amplified CCND1/IGH fusion gene. *Genes Chromosomes Cancer* 2002;33:206–12.
- [16] Salaverria I, Espinet B, Carrio A, Costa D, Astier L, Slotta-Huspenina L, et al. Multiple recurrent chromosomal breakpoints in mantle cell lymphoma revealed by a combination of molecular cytogenetic techniques. *Genes Chromosomes Cancer* 2008;47:1086–97.
- [17] Martin-Subero JI, Otero MD, Hernandez R, Cigudosa JC, Agirre X, Saez B, et al. Amplification of IGH/MYC fusion in clinically aggressive IGH/BCL2-positive germinal center B-cell lymphomas. *Genes Chromosomes Cancer* 2005;43:414–23.
- [18] Zhu C, Mills KD, Ferguson DO, Lee C, Manis J, Fleming J, et al. Unrepaired DNA breaks in p53-deficient cells lead to oncogenic gene amplification subsequent to translocations. *Cell* 2002;109:811–21.
- [19] Wlodarska I, Meeus P, Stul M, Thienpont L, Wouters E, Marcelis L, et al. Variant t(2;11)(p11;q13) associated with the IgK-CCND1 rearrangement is a recurrent translocation in leukemic small-cell B-non-Hodgkin lymphoma. *Leukemia* 2004;18:1705–10.
- [20] Komatsu H, Lida S, Yamamoto K, Mikuni C, Nitta M, Takahashi T, et al. A variant chromosome translocation at 11q13 identifying PRAD1/Cyclin D1 as the bcl-1 gene. *Blood* 1994;84:1226–31.
- [21] Espinet B, Salaverria I, Bea S, Ruiz-Xiville N, Balague O, Salido M, et al. Incidence and prognostic impact of secondary cytogenetic aberrations in a series of 145 patients with mantle cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2010;49:439–51.
- [22] Rocha CK, Praulich I, Gehrke I, Hallek M, Kreuzer KA. A rare case of t(11;22) in a mantle cell lymphoma like B-cell neoplasia resulting in a fusion of IGL and CCND1: case report. *Mol Cytogenet* 2011;4:8.
- [23] Fu K, Weisenburger DD, Greiner TC, Dave S, Wright G, Rosenwald A, et al. Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma: a clinicopathological study based on gene expression profiling. *Blood* 2005;106:4315–21.
- [24] Gesk S, Klapper W, Martin-Subero JI, Nagel I, Harder L, Fu K, et al. A chromosomal translocation in cyclin D1-negative/cyclin D2-positive mantle cell lymphoma fuses the CCND2 gene to the IGK locus. *Blood* 2006;108:1109–10.
- [25] Shiller SM, Zieske A, Holmes III H, Feldman AL, Law ME, Saad R. CD5-positive, cyclinD1-negative mantle cell lymphoma with a translocation involving the CCND2 gene and the IGL locus. *Cancer Genet* 2011;204:162–4.
- [26] Herens C, Lambert F, Quintanilla-Martinez L, Bisig B, Deusinges C, de LL. Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma with cryptic t(12;14)(p13;q32) and cyclin D2 overexpression. *Blood* 2008;111:1745–6.
- [27] Quintanilla-Martinez L, Slotta-Huspenina J, Koch I, Klier M, Hsi ED, de LL, et al. Differential diagnosis of cyclin D2+ mantle cell lymphoma based on fluorescence in situ hybridization and quantitative real-time-PCR. *Haematologica* 2009;94:1595–8.
- [28] Wlodarska I, Dierickx D, Vanhentenrijk V, Van RK, Pospisilova H, Minnei F, et al. Translocations targeting CCND2, CCND3, and MYCN do occur in t(11;14)-negative mantle cell lymphomas. *Blood* 2008;111:5683–90.
- [29] Salaverria I, Zettl A, Bea S, Moreno V, Valls J, Hartmann E, et al. Specific secondary genetic alterations in mantle cell lymphoma provide prognostic information independent of the gene expression-based proliferation signature. *J Clin Oncol* 2007;25:1216–22.
- [30] Hartmann EM, Campo E, Wright G, Lenz G, Salaverria I, Jares P, et al. Pathway discovery in mantle cell lymphoma by integrated analysis of high-resolution gene expression and copy number profiling. *Blood* 2010;116:953–61.
- [31] Tirier C, Zhang Y, Plendl H, Weber-Matthies K, Langer W, Heit W, et al. Simultaneous presence of t(11;14) and a variant Burkitt's translocation in the terminal phase of a mantle cell lymphoma. *Leukemia* 1996;10:346–50.
- [32] Hao S, Sanger W, Onciu M, Lai R, Schlette EJ, Medeiros LJ. Mantle cell lymphoma with 8q24 chromosomal abnormalities: a report of 5 cases with blastoid features. *Mod Pathol* 2002;15:1266–72.
- [33] Vaishampayan UN, Mohamed AN, Dugan MC, Bloom RE, Palutke M. Blastoid mantle cell lymphoma associated with Burkitt-type translocation and hypodiploidy. *Br J Haematol* 2001;115:66–8.
- [34] Michaux L, Wlodarska I, Theate I, Stul M, Scheiff JM, Deneys V, et al. Coexistence of BCL1/CCND1 and CMYC aberrations in blastoid mantle cell lymphoma: a rare finding associated with very poor outcome. *Ann Hematol* 2004;83:578–83.
- [35] Oliveira FM, Tone LG, Simoes BP, Rego EM, Araujo AG, Falcao RP. Blastoid mantle cell lymphoma with t(2;8)(p12;q24). *Leuk Lymphoma* 2007;48:2079–82.
- [36] Salaverria I, Siebert R. The gray zone between Burkitt's lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma from a genetics perspective. *J Clin Oncol* 2011;29:1835–43.
- [37] Mossafa H, Damotte D, Jenabian A, Delarue R, Vincenneau A, Amouroux I, et al. Non-Hodgkin's lymphomas with Burkitt-like cells are associated with c-Myc amplification and poor prognosis. *Leuk Lymph* 2006;47:1885–93.
- [38] Au WY, Horsman DE, Gascoyne RD, Viswanatha DS, Klasa RJ, Connors JM. The spectrum of lymphoma with 8q24 aberrations: a clinical, pathological and cytogenetic study of 87 consecutive cases. *Leuk Lymph* 2004;45:519–28.
- [39] Au WY, Horsman DE, Viswanatha DS, Connors JM, Klasa RJ, Gascoyne RD. 8q24 translocations in blastic transformation of mantle cell lymphoma. *Haematologica* 2000;85:1225–7.
- [40] Au WY, Gascoyne RD, Viswanatha DS, Connors JM, Klasa RJ, Horsman DE. Cytogenetic analysis in mantle cell lymphoma: a review of 214 cases. *Leuk Lymph* 2002;43:783–91.
- [41] Wlodarska I, Pittaluga S, Hagemeyer A, Wolf-Peters C, Van Den BH. Secondary chromosome changes in mantle cell lymphoma. *Haematologica* 1999;84:594–9.
- [42] Ott G, Kalla J, Ott MM, Schryen B, Katzenberger T, Muller JG, et al. Blastoid variants of mantle cell lymphoma: frequent bcl-1 rearrangements at the major translocation cluster region and tetraploid chromosome clones. *Blood* 1997;89:1421–9.
- [43] Bea S, Campo E. Secondary genomic alterations in non-Hodgkin's lymphomas: tumor-specific profiles with impact on clinical behavior. *Haematologica* 2008;93:641–5.
- [44] 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.
- [45] 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.
- [46] Martínez-Climent JA, Vizcarra E, Sanchez D, Blesa D, Marugan 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.
- [47] 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.
- [48] Jarosova M, Papajik T, Holzerova M, Dusek L, Pikalova Z, Lakoma I, et al. High incidence of unbalanced chromosomal changes in mantle cell lymphoma detected by comparative genomic hybridization. *Leuk Lymph* 2004;45:1835–46.
- [49] Ferrer A, Salaverria I, Bosch F, Villamor N, Rozman M, Bea S, et al. Leukemic involvement is a common feature in mantle cell lymphoma. *Cancer* 2007;109:2473–80.
- [50] Camacho E, Hernandez L, Hernandez S, Tort F, Bellosillo B, Bea S, et al. ATM gene inactivation in mantle cell lymphoma mainly occurs by truncating mutations and missense mutations involving the phosphatidylinositol-3 kinase domain and is associated with increasing numbers of chromosomal imbalances. *Blood* 2002;99:238–44.
- [51] Greiner TC, Dasgupta C, Ho VV, Weisenburger DD, Smith LM, Lynch JC, 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* 2006;103:2352–7.
- [52] Kohlhammer H, Schwaben 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.
- [53] Rubio-Moscardo F, Climent J, Siebert R, Piris MA, Martin-Subero JI, Nielander 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.
- [54] 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* 2000;97:2773–8.
- [55] 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.
- [56] Tagawa H, Kaman 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.
- [57] Flordal TE, Ichimura K, Collins VP, Walsh SH, Barbany G, Hagberg A, et al. Detailed assessment of copy number alterations revealing homozygous deletions in 1p and 13q in mantle cell lymphoma. *Leuk Res* 2007;31:1219–30.
- [58] Rinaldi A, Kwee I, Taborelli M, Largo C, Uccella S, Martin V, et al. Genomic and expression profiling identifies the B-cell associated tyrosine kinase Syk as a possible therapeutic target in mantle cell lymphoma. *Br J Haematol* 2006;132:303–16.
- [59] Vater I, Wagner F, Kreuz M, Berger H, Martin-Subero JI, Pott C, et al. GeneChip analyses point to novel pathogenetic mechanisms in mantle cell lymphoma. *Br J Haematol* 2009;144:317–31.
- [60] Bea S, Salaverria I, Armengol L, Pinyol M, Fernandez V, Hartmann EM, et al. Uniparental disomies, homozygous deletions, amplifications, and target genes in mantle cell lymphoma revealed by integrative high-resolution whole-genome profiling. *Blood* 2009;113:3059–69.
- [61] Kawamata N, Ogawa S, Gueller S, Ross SH, Huynh T, Chen J, et al. Identified hidden genomic changes in mantle cell lymphoma using high-resolution single nucleotide polymorphism genomic array. *Exp Hematol* 2009;37:937–46.
- [62] Halldorsdottir AM, Sander B, Goransson H, Isaksson A, Kimby E, Mansouri M, et al. High-resolution genomic screening in mantle cell lymphoma—specific changes correlate with genomic complexity, the proliferation signature and survival. *Genes Chromosomes Cancer* 2011;50:113–21.
- [63] Pinyol M, Bea S, Pla L, Ribrag V, Bosq J, Rosenwald A, et al. Inactivation of RB1 in mantle-cell lymphoma detected by nonsense-mediated mRNA decay pathway inhibition and microarray analysis. *Blood* 2007;109:5422–9.
- [64] Honma K, Tsuzuki S, Nakagawa M, Tagawa H, Nakamura S, Morishima Y, et al. TNFAIP3/A20 functions as a novel tumor suppressor gene in several subtypes of non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 2009;114:2467–75.
- [65] Navarro A, Bea S, Fernandez V, Prieto M, Salaverria I, Jares P, et al. MicroRNA expression, chromosomal alterations, and immunoglobulin variable heavy chain hypermutations in Mantle cell lymphomas. *Cancer Res* 2009;69:7071–8.
- [66] Coquelle A, Pipiras E, Toledo F, Buttin G, Debatisse M. Expression of fragile sites triggers intrachromosomal mammalian gene amplification and sets boundaries to early amplicons. *Cell* 1997;89:215–25.
- [67] Stephens PJ, McBride DJ, Lin ML, Varela I, Pleasance ED, Simpson JT, et al. Complex landscapes of somatic rearrangement in human breast cancer genomes. *Nature* 2009;462:1005–10.
- [68] Hernandez L, Bea S, Pinyol M, Ott G, Katzenberger T, Rosenwald A, et al. CDK4 and MDM2 gene alterations mainly occur in highly proliferative and aggressive mantle cell lymphomas with wild-type INK4a/ARF locus. *Cancer Res* 2005;65:2199–206.
- [69] Kotake Y, Zeng Y, Xiong Y, DDB1-CUL4A, MLL1 mediate oncogene-induced p16INK4a activation. *Cancer Res* 2009;69:1809–14.
- [70] Pinyol M, Hernandez L, Martinez 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.
- [71] Tort F, Hernandez S, Bea S, Martinez A, Esteller M, Herman JG, et al. CHK2-decreased protein expression and infrequent genetic alterations mainly occur in aggressive types of non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 2002;100:4602–8.
- [72] Tort F, Hernandez S, Bea S, Camacho E, Fernandez V, Esteller M, et al. Checkpoint kinase 1 (CHK1) protein and mRNA expression is downregulated in aggressive variants of human lymphoid neoplasms. *Leukemia* 2005;19:112–7.
- [73] Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005;352:1779–90.
- [74] Bruce S, Leinonen R, Lindgren CM, Kivinen K, Hlman-Wright K, Lipsanen-Nyman M, et al. Global analysis of uniparental disomy using high density genotyping arrays. *J Med Genet* 2005;42:847–51.
- [75] O'shea D, O'Riain C, Gupta M, Waters R, Yang Y, Wrench D, et al. Regions of acquired uniparental disomy at diagnosis of follicular lymphoma are associated with both overall survival and risk of transformation. *Blood* 2009;113:2298–301.
- [76] Kawamata N, Ogawa S, Zimmermann M, Kato M, Sanada M, Hemminki K, et al. Molecular allelokaryotyping of pediatric acute lymphoblastic leukemias by high-resolution single nucleotide polymorphism oligonucleotide genomic microarray. *Blood* 2008;111:776–84.
- [77] Katzenberger T, Kienle D, Stilgenbauer S, Holler S, Schilling C, Mader U, et al. Delineation of distinct tumour profiles in mantle cell lymphoma by detailed cytogenetic, interphase genetic and morphological analysis. *Br J Haematol* 2008;142:538–50.
- [78] Parry-Jones N, Matutes E, Morilla R, Brito-Babapulle V, Wotherspoon A, Swansbury GJ, et al. Cytogenetic abnormalities additional to t(11;14) correlate with clinical features in leukaemic presentation of mantle cell lymphoma, and may influence prognosis: a study of 60 cases by FISH. *Br J Haematol* 2007;137:117–24.
- [79] Halldorsdottir AM, Lundin A, Murray F, Mansouri L, Knuutila S, Sundstrom C, et al. Impact of TP53 mutation and 17p deletion in mantle cell lymphoma. *Leukemia* 2011. E Published.
- [80] Zenz T, Mertens D, Dohner H, Stilgenbauer S. Importance of genetics in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Rev* 2011;25:131–7.
- [81] Espinet B, Sole F, Pedro C, Garcia M, Bellosillo B, Salido M, et al. 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* 2005;36:1232–7.
- [82] 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* 2003;34:1030–4.
- [83] Hernandez L, Fest T, Cazorla M, Teruya-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.
- [84] 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.
- [85] Hangaishi A, Ogawa S, Qiao Y, Wang L, Hosoya N, Yuji K, et al. Mutations of Chk2 in primary hematopoietic neoplasms. *Blood* 2002;99:3075–7.
- [86] Morin RD, Johnson NA, Severson TM, Mungall AJ, An J, Goya R, et al. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat Genet* 2010;42:181–5.
- [87] Pasqualucci L, Dominguez-Sola D, Chiarenza A, Fabbri G, Grunn A, Trifonov V, et al. Inactivating mutations of acetyltransferase genes in B-cell lymphoma. *Nature* 2011;471:189–95.
- [88] Mullighan CG, Zhang J, Kasper LH, Lerach S, Payne-Turner D, Phillips LA, et al. CREBBP mutations in relapsed acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 2011;471:235–9.
- [89] Greif PA, Yaghmaie M, Konstandin NP, Ksienzyk B, Alimoghaddam K, Ghavamzadeh A, et al. Somatic mutations in acute promyelocytic leukemia (APL) identified by exome sequencing. *Leukemia* 2011;25:1519–22.
- [90] Tiacci E, Trifonov V, Schiavoni G, Holmes A, Kern W, Martelli MP, et al. BRAF mutations in hairy-cell leukemia. *N Engl J Med* 2011;364:2305–15.
- [91] Steidl C, Shah SP, Woolcock BW, Rui L, Kawahara M, Farinha P, et al. MHC class II transactivator CIITA is a recurrent gene fusion partner in lymphoid cancers. *Nature* 2011;471:377–81.
- [92] Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordóñez GR, Villamor N, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Nature* 2011;475:101–5.
- [93] Fabbri G, Rasi S, Rossi D, Trifonov V, Khatibian H, Ma J, et al. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *J Exp Med* 2011;208:1389–401.
- [94] Lecluse Y, Lebailly P, Roulland S, Gac AC, Nadel B, Gauduchon P. t(11;14)-positive clones can persist over a long period of time in the peripheral blood of healthy individuals. *Leukemia* 2009;23:1190–3.

DISCUSIÓN

Los resultados de esta tesis permiten profundizar en el reconocimiento y la clasificación del linfoma de células del manto (MCL). Los criterios de clasificación de los linfomas se han ido ajustando a medida que hemos sido capaces de examinar con profundidad las células tumorales mediante nuevas técnicas. El análisis morfológico exhaustivo a través del microscopio de los tejidos afectados proporciona la primera perspectiva de la enfermedad. Sin embargo, debido a la gran complejidad y heterogeneidad de las neoplasias linfoides cada vez es más necesaria la contribución de la biología molecular. El estudio de las alteraciones cromosómicas, las mutaciones puntuales o la expresión génica, son útiles en la clasificación y el diagnóstico de los pacientes, y nos ayudan a aplicar estos conocimientos para el tratamiento más adecuado de cada enfermedad.

En esta tesis hemos centrado nuestros estudios en subtipos inhabituales de MCL. Por un lado, en los dos primeros trabajos, hemos estudiado los pacientes de MCL que no presentan la translocación principal t(11;14), característica que ha sido objeto de discusión al pensar que el diagnóstico de MCL podía no ser el correcto. En el tercer trabajo, hemos estudiado los MCL con presentación clínica indolente, larga supervivencia, y que no requieren tratamiento durante largos periodos de tiempo, particularidad llamativa en los pacientes de MCL.

El MCL ciclina D1 negativo fue identificado por primera vez en un estudio de perfil de expresión génica de seis casos (Fu et al., 2005) donde fue descrito como una neoplasia de células B con una morfología, inmunofenotipo y características de expresión génica típicas de MCL convencional, pero careciendo de la translocación t(11;14)(q13;q32) y de la expresión de ciclina D1, y en su lugar, sobreexpresaba la ciclina D2 o la D3. Los estudios genéticos posteriores de casos ocasionales demostraron que los MCL ciclina D1 negativos podían tener translocaciones cromosómicas fusionando la ciclina D2 o la D3 a las cadenas ligeras o pesadas de los genes de las inmunoglobulinas (Wlodarska et al., 2008; Gesk et al., 2006; Herens et al., 2008). Además, la semejanza con los MCL convencionales en cuanto a las alteraciones genéticas secundarias que presentaban era evidente (Salaverria et al., 2007; Hartmann et al., 2010), y sugería que ambos formaban parte de la misma entidad biológica. El número de casos publicados era todavía muy limitado y las características clínicas de los pacientes aún no estaban bien definidas. En el primer trabajo de esta tesis, ampliamos estas observaciones incluyendo cinco casos nuevos y actualizamos el seguimiento de siete pacientes publicados anteriormente (Fu et al., 2005; Chuang et al., 2006). La mayoría de los MCL ciclina D1 negativo de nuestro trabajo tenían un comportamiento clínico agresivo y una supervivencia similar a los

pacientes de MCL ciclina D1 positivos, hecho que hace que sea más necesario disponer de marcadores fiables para identificar estos casos y poderlos distinguir de otros linfomas de célula B (como la leucemia linfática crónica (CLL) (De Oliveira et al., 1989) o el linfoma de zona marginal (MZL) (Isaacson et al., 1991)) ya que la supervivencia en estos otros pacientes es generalmente superior y las estrategias terapéuticas empleadas en cada tipo son distintas.

Por otro lado, el factor de transcripción *SOX11*, en condiciones normales se expresa en el sistema nervioso central en desarrollo, y se ha visto recientemente sobreexpresado en algunas neoplasias linfoides como en el MCL (Fernández et al., 2010; Ek et al., 2008) y en gliomas malignos (Weigle et al., 2005).

Debido a que el MCL ciclina D1 negativo no es fácil de reconocer, nuestro primer objetivo fue determinar el valor de la expresión de *SOX11* como marcador de estos MCL especiales, ya que dos estudios previos habían mostrado que la sobreexpresión de *SOX11* era altamente específica de MCL al ser detectado en el 90% de estos tumores pero no en las CLL ni en los linfomas foliculares (FL) y solamente se expresaba de forma débil en un 7% de casos diagnosticados de linfoma difuso de células B grandes (DLBCL) (Ek et al., 2008; Wang et al., 2008).

En primer lugar, confirmamos la expresión de *SOX11* en los MCL ciclina D1 positivos al revisar la base de datos del perfil de expresión de los casos analizados en el consorcio del *Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project* (LLMPP). Tal como esperábamos y conocíamos por la literatura, *SOX11* estaba altamente expresado en casi todos los MCL convencionales (98%) pero sus niveles fueron indetectables en todos los FL, DLBCL, y linfoma primario mediastínico de células B grandes (PMLBL) examinados. Cabe destacar que el 33% de los casos de linfoma de Burkitt (BL) también mostró niveles moderados de *SOX11*.

Validamos estas observaciones mediante PCR cuantitativa (qRT-PCR) e inmunohistoquímica (IHQ) en casos adicionales de MCL y otras neoplasias linfoides de célula B. El 93% de los MCL mostró expresión proteica nuclear, pero ésta fue negativa en los casos de CLL, FL, MZL, DLBCL, en los linfomas de células T y en el linfoma de Hodgkin. Tal y como habíamos observado en el estudio de *arrays* de expresión génica, encontramos expresión variable de *SOX11* en el BL, en dos de los tres casos de leucemia prolinfocítica de célula T (T-PLL) analizados y en todos los casos de linfoma linfoblástico (LBL). Sin embargo estos tumores no se suelen confundir con MCL. Curiosamente, en algunos linfomas y en ganglios reactivos observamos una tinción caracterizada por un patrón punteado en el citoplasma de significado incierto, pero que no parece corresponder a la expresión propia de *SOX11* ya que en MCL no se ha detectado, y por

array y qRT-PCR no se detectan niveles de mRNA de SOX11 en tejidos reactivos. Estos hallazgos confirman que los niveles altos de mRNA de SOX11 y la detección de proteína nuclear son marcadores fiables de MCL.

De acuerdo con estos resultados, nos interesamos en investigar la expresión de SOX11 en los MCL ciclina D1 negativos. Todos los casos mostraron expresión nuclear intensa de SOX11 indicando que éste podía ser un buen marcador para identificar estos tumores. Ek *et al.* (Ek *et al.*, 2008), incluyeron un caso aparentemente negativo para la ciclina D1, pero que presentaba la translocación t(11;14) y por eso, la ausencia de detección de la ciclina D1 era probablemente debida a un problema técnico de la IHQ. Esta observación sugiere que *SOX11* puede ser un marcador fiable para diagnosticar también los MCL convencionales cuando falla la detección de ciclina D1 por razones técnicas. Además, reforzando el papel de *SOX11* como marcador biológico específico de MCL, Gradowski *et al.* (Gradowski *et al.*, 2012) ha identificado un grupo de CLL (10%) con sobreexpresión de ciclina D1. Estos casos se podrían confundir fácilmente con los MCL debido a sus similitudes morfológicas. Sin embargo, estas CLL con ocasionales células ciclina D1 positivas en las zonas de proliferación fueron negativas para SOX11.

Recientemente, se ha observado que la variante morfológica blastoide de MCL puede presentarse sin la t(11;14) y la expresión de SOX11 también fue positiva en estos casos (Zeng *et al.*, 2012) por lo que dicho biomarcador resulta de gran utilidad en el reconocimiento del MCL en todas sus variantes.

En nuestro estudio, los casos analizados de MCL ciclina D1 negativo mostraron niveles altos de ciclina D2 y D3, confirmando los resultados de los *arrays* de expresión publicados de los seis primeros casos descritos (Fu *et al.*, 2005) y en un caso demostramos un reordenamiento de ciclina D2 mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH). Inmunohistoquímicamente, las ciclinas D2 y D3 fueron detectados en los tumores de MCL ciclina D1 negativos, pero también en la mayoría del resto de neoplasias linfoides de célula B sin grandes diferencias en la intensidad de la tinción por lo que su valor en el diagnóstico diferencial de estos tumores es limitado.

Como conclusión del primer trabajo, podemos confirmar la elevada especificidad de la expresión de SOX11 a nivel de mRNA y de proteína nuclear como marcadores de MCL. Hemos observado por primera vez que la detección de este factor de transcripción es un biomarcador útil para identificar los MCL ciclina D1 negativos. Aunque *SOX11* también puede ser detectado en algunos BL, LBL y T-PLL, las diferencias morfológicas y fenotípicas de estos tumores permiten el reconocimiento fácil de estos casos de MCL ciclina D1 negativos.

En el segundo trabajo de esta tesis, hemos ampliado la serie de MCL ciclina D1 negativo hasta alcanzar los 40 pacientes, todos con sobreexpresión del biomarcador *SOX11*, para estudiar su caracterización genética, molecular y clínica, y compararlo con los MCL convencionales ciclina D1 positivos.

La morfología de todos los casos era indistinguible de los MCL ciclina D1 positivos. Solamente se describió un caso con morfología blastoide. Casi todos los casos fueron positivos para CD5, y negativos para CD23, CD10 y p27, tal como se espera del MCL convencional.

Demostramos que más de la mitad de los MCL ciclina D1 negativo (22 de 40) presentan reordenamientos de *CCND2* con genes de las inmunoglobulinas (*IG*) *heavy*, *kappa* y *lambda*. Además, dos casos que tenían rotura de *CCND2* no mostraron reordenamientos de los genes de las *IG*. Este hecho indicaría la existencia probable de una translocación con otros genes que desconocemos. Tal como observamos en la literatura, encontramos niveles altos de mRNA de ciclina D2 concretamente en los casos con la translocación de la *CCND2*. En los casos sin reordenamientos de *CCND2*, no podemos excluir puntos de rotura de la ciclina D2 en localizaciones 5' ó 3' más lejanos, o bien, inserciones de *CCND2* en otro *locus*. Sin embargo, este hecho parece ser improbable ya que los casos sin la translocación de *CCND2* tienen niveles bajos de ciclina D2, sugiriendo que otro mecanismo debe estar involucrado en la patogénesis de estos linfomas. En los 40 casos analizados, no encontramos translocaciones en la ciclina D3. Esta observación concuerda con la literatura ya que solamente se ha encontrado un caso con dicha translocación (Wlodarska et al., 2008) y los MCL con sobreexpresión de ciclina D3 en este subgrupo no presentaban translocación en la *CCND3* que explicara su sobreexpresión (Fu et al., 2005).

En algunos BL, linfoma difuso de células grandes (DLBCL) (Pasqualucci et al., 2011) y CLL (Puente et al., 2011) (Schmitz et al., 2011) se han observado mutaciones en el sitio de fosforilación de los genes de las ciclinas D. Estas mutaciones eliminan el residuo de fosforilación necesario para la exportación nuclear de las ciclinas y su consiguiente degradación por el proteosoma, y como consecuencia se genera una proteína más estable con altos niveles de expresión. En base a estas observaciones, postulamos que una forma alternativa de activación de estas ciclinas podía ser la presencia de mutaciones similares. Al analizar las posibles mutaciones en los casos sin reordenamientos en *CCND2* (que representan el 45% de nuestra serie) no encontramos ninguna mutación, por lo que descartamos este mecanismo como alteración genética alternativa a la translocación. Se necesitan más estudios para esclarecer el posible evento genético primario de estos tumores.

La complejidad genética y el perfil genómico de los 32 MCL ciclina D1 negativos que se pudieron analizar por *array* de CGH mostraron que estos casos son similares a los MCL convencionales ciclina D1 positivos (Salaverria et al., 2007; Beà et al., 2009). La frecuencia de deleciones que involucran genes específicos como *TP53*, *CDKN2A*, y *ATM* fue similar entre los MCL ciclina D1 positivos y negativos. Aunque observamos que la pérdida de *ATM* era significativamente más frecuente en casos sin reordenamientos de *CCND2*. En cambio, las pérdidas de *TP53* resultaron más frecuentes en casos con translocaciones en *CCND2*. Además, la proporción de pérdidas de 9p en los MCL ciclina D1 negativo, tanto los *CCND2* translocados como los no translocados, fue más elevada (47%) comparado con los MCL convencionales ciclina D1 positivo que se conocen en la literatura (7-30% por CGH convencional, 10-36% en plataformas de *arrays*). Además, el patrón de pérdidas del cromosoma 9, especialmente de 9p en los MCL ciclina D1 negativo fue complejo, incluyendo casos con deleciones simples de *CDKN2A*: focales, o más amplias, o incluyendo todo el brazo corto de 9, deleciones homocigotas puntuales, monosomía de todo el cromosoma 9, casos con múltiples pérdidas independientes en el 9p y también casos con pérdidas independientes de 9q.

De forma interesante, en dos casos vimos ganancias del cluster mir17-92 del microRNA en 13q31.3, el cual se ha observado sobreexpresado en distintos tipos de cáncer, especialmente en MCL cooperando con *MYC* (Tagawa et al., 2005; Navarro et al., 2009; Olive et al., 2010) regulando el desarrollo del tumor.

El reconocimiento de los MCL ciclina D1 negativo se hace difícil al no tener biopsias de calidad suficientemente buena para hacer estudios de expresión génica, tal y como se reconocieron estos casos inicialmente (Fu k et al., 2005). Por otro lado, el material fijado en formalina y embebido en parafina (FFPE) que no es válido para algunas técnicas, se puede utilizar ampliamente con técnicas rutinarias como la IHQ para detección de SOX11 y así ayudar a la identificación de estos tumores. La detección de reordenamientos de *CCND2* mediante FISH o mediante la cuantificación de niveles de mRNA de *CCND2* mediante qRT-PCR son un buen complemento esta identificación.

Este estudio incluye la serie más larga de estos pacientes peculiares de MCL sin la translocación típica de MCL ni la sobreexpresión de ciclina D1. De esta manera hemos podido obtener una visión más amplia de estos casos en los que su morfología, inmunohistoquímica y características genéticas han resultado ser similares a los MCL ciclina D1 positivos. Estas características, la positividad de SOX11 y el reordenamiento de *CCND2* aproximadamente en la

mitad de los casos permiten diagnosticar estos pacientes con fiabilidad y distinguirlos de otros linfomas de células B parecidos, pero con una conducta biológica diferente.

En el tercer trabajo, nos centramos en el reconocimiento del grupo de pacientes de MCL que no necesita tratamiento durante largos periodos de tiempo y que el retraso del tratamiento no parece afectar a la supervivencia de los pacientes (Espinete et al., 2005; Eve et al., 2009; Martin et al., 2009; Fernández et al., 2010; Nodit et al., 2003; Ondrejka et al., 2011; Orchard et al., 2003; Kimura et al., 2011). Esta idea está modificando la manera de entender el MCL, ya que en términos generales, está considerado como un linfoma agresivo que requiere un tratamiento intensivo inmediato. Esta situación representa un reto porque estudios recientes también han mostrado que el tratamiento incluyendo quimioterapias intensivas y trasplante de células madre hematopoyéticas puede significar una mejora en la supervivencia de los pacientes con MCL, pero estos tratamientos no están exentos de riesgo, por lo que es importante identificar pacientes con MCL que puedan no necesitar un tratamiento agresivo como primera opción (Romaguera et al., 2010; Dreyling et al., 2005; Geiser et al., 2008). De este modo, resulta de gran importancia el desarrollo de criterios biológicos que puedan ayudar en la selección del tratamiento adecuado para los pacientes de MCL.

En un estudio reciente de nuestro grupo (Fernández et al., 2010) comparamos un subgrupo de pacientes de MCL con un comportamiento clínico indolente que no necesitó quimioterapia durante un mínimo de 2 años, con un grupo de pacientes con MCL convencional (cMCL) que requirió tratamiento desde el diagnóstico. Los MCL indolentes tenían un perfil de rasgos clínicos y biológicos que diferían de los cMCL sugiriendo que, al menos, un subgrupo de casos podía corresponder a un subtipo biológico particular de la enfermedad. Sin embargo, este estudio tenía las limitaciones de contar con un número de pacientes relativamente pequeño, además de su alto grado de selección. Ambos, los MCL indolentes y los convencionales (cMCL) tenían un perfil de expresión global similar, sugiriendo que pertenecen a la misma enfermedad molecular pero también diferían en la expresión de una pequeña firma de 13 genes que estaba altamente expresada en cMCL pero era negativa o muy baja en los tumores de los pacientes de comportamiento indolente (Fernández et al., 2010).

En este estudio, diseñamos y validamos un ensayo de qRT-PCR seleccionando tres genes de la firma previa de perfil de expresión génica que distingue los MCL indolentes de los convencionales. Los genes seleccionados fueron *SOX11*, *HDGFRP3* y *DBN1* al presentar buena correlación entre la qRT-PCR y los *arrays* de expresión.

Debido a que los MCL presentan frecuentemente enfermedad leucémica no ganglionar, aplicamos este ensayo a muestras de sangre en una serie nueva de 68 pacientes de MCL que fueron seleccionados solamente en base a la expresión leucémica sin tener en cuenta otras manifestaciones clínicas o de supervivencia. La combinación de la expresión de estos tres genes segregó dos grupos de MCL con alta y baja expresión de esta firma simplificada. En general, los niveles de expresión de estos tres genes van en el mismo sentido. Los tres tienen niveles altos o los tres niveles bajos de expresión. Pero al intentar simplificar el ensayo en uno o dos marcadores en lugar de tres, algunos pocos casos no coincidían en el sentido de la expresión y quedaban clasificados en un grupo u otro según el gen seleccionado. Por ejemplo, dos pacientes con expresión alta de *SOX11*, tenían niveles bajos de *HDGFRP3*, o un paciente con expresión baja de *SOX11*, tenía niveles altos de *HDGFRP3*. Además, también observamos discordancias con *DBN1*, con cinco casos *SOX11* positivos pero niveles negativos de *DBN1*. Finalmente, el ensayo con los tres genes conjuntos nos permite clasificar molecularmente estos dos tipos de MCL mediante la suma de la expresión relativa de los genes normalizados y así poder predecir el grupo de alta o baja expresión de la firma al que pertenece cada caso.

El subgrupo de tumores con baja expresión, presentaba más frecuentemente mutaciones de *IGHV* y pocas alteraciones genéticas además de una presentación clínica no ganglionar. Más de la mitad de los casos (53%) no mostraba alteraciones cromosómicas o sólo una (7q ó 13q). Únicamente el 35% tenía genomas de alta complejidad (≥ 5 alteraciones por caso) en comparación con el 80% de los MCL de alta expresión de la firma de genes. El tratamiento con quimioterapia fue usado con menos frecuencia en los pacientes del grupo de expresión baja y presentaron una supervivencia significativamente superior (75% a los 5 años), en cambio los tumores con alta expresión tenían características de MCL convencional. Estos hallazgos reforzaban la idea de la existencia de 2 subtipos de MCL con características clínicas y biológicas distintas. En nuestra serie de pacientes, la ausencia de presentación ganglionar se correlaciona con un mejor pronóstico en comparación con los pacientes con presencia de adenopatías, tal como se había observado previamente en otros estudios (Orchard et al., 2003; Martin et al., 2011). Además, nuestro trabajo también indica que los pacientes sin presentación ganglionar en el diagnóstico se pueden separar en base a la expresión de tres genes de la firma. Los tumores con altos niveles de expresión tienen un comportamiento clínico más agresivo, y una supervivencia significativamente más corta que los pacientes con firma baja. Uno de los 3 genes seleccionados es *SOX11*, un marcador fiable de MCL en el que su relación entre expresión negativa y mejor pronóstico se ha observado en dos estudios independientes (Fernández et al., 2010; Ondrejka et al., 2011).

A pesar del buen pronóstico global de nuestros pacientes con baja expresión, algunos de ellos fallecieron al poco tiempo del diagnóstico o desarrollaron progresión de la enfermedad. Observamos que la detección de la deleción de 17p tenía un impacto adverso en la supervivencia de estos pacientes, en que de manera similar al cMCL y otras neoplasias linfoides, la adquisición de alteraciones de 17p/*TP53* pueden ser también un mecanismo de progresión tumoral en MCL no ganglionar perjudicando la supervivencia (Hernández et al., 1996; Greiner et al., 96; Beà et al., 1999; Slotta-Huspenina et al., 2012).

Contrariamente a los hallazgos de este trabajo, dos grupos han demostrado que los pacientes de MCL sin expresión de *SOX11*, requieren tratamiento en el diagnóstico y tienen mal pronóstico (Wang et al., 2008; Nygren et al., 2012). Una posible explicación de estas diferencias se puede deber a que el material que han estudiado son biopsias ganglionares, hecho que sugiere que estos pacientes se pueden encontrar en una fase avanzada de la enfermedad con afectación ganglionar en la que han adquirido alteraciones oncogénicas que conllevan a un comportamiento agresivo de la enfermedad.

Todos los hallazgos de nuestro estudio indican que el MCL presentado con leucemia, sin afectación ganglionar y baja expresión de la firma de 3 genes, puede corresponder a un subtipo biológico y clínico de la enfermedad con un comportamiento clínico más indolente. La selección de un término para nombrar este subtipo de tumores no es fácil. Sugerimos el término de MCL no-ganglionar para estos casos ya que, aunque no es enteramente específico, esta característica se encuentra en la mayoría de los pacientes, y por otro lado, es una de las observaciones que permitió el reconocimiento inicial de este subgrupo de pacientes (Orchard et al., 2003). La presencia de alteraciones 17p/*TP53* en estos pacientes empeora su pronóstico sugiriendo que puede influir en la progresión de la enfermedad. La evaluación de la firma de los tres genes (*SOX11*, *HDGFRP3* y *DBN1*) en muestras leucémicas junto con el estudio de 17p/*TP53* puede ayudar a identificar este subgrupo particular de MCL y determinar un parámetro de riesgo alto en la evolución de los pacientes, respectivamente. Estos estudios pueden ayudar en las estrategias de selección de tratamientos más ajustados a la biología de la enfermedad de los pacientes de MCL.

En resumen, estos estudios profundizan en el conocimiento y el diagnóstico tanto del subtipo clínico indolente en que se puede presentar el MCL, como del subtipo con ausencia de sobreexpresión de ciclina D1, y pueden proporcionar una evaluación más precisa del tumor y una ayuda en la decisión del tratamiento más adecuado para cada paciente. Los resultados

obtenidos ayudarán al desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico precoz y al desarrollo de fármacos más específicos para el tratamiento de los pacientes que sufren este tipo de linfoma.

Tabla resumen de los trabajos de esta tesis:

LINFOMA DE CÉLULAS DEL MANTO		
t(11;14)(q13;q32) (99%)		NO t(11;14)(q13;q32) (1%)
ciclina D1 ↑↑		ciclina D2 ↑↑ (55%) ciclinas? (45%)
<i>IGH-CCND1</i> (99%) <i>IGK-CCND1</i> (0.5%) <i>IGL-CCND1</i> (0.5%)		<i>IGK-CCND2</i> (45%) <i>IGL-CCND2</i> (23%) <i>IGH-CCND2</i> (14%) ¿?- <i>CCND2</i> (18%) translocación primaria NO encontrada
<i>SOX11</i> ↑↑ (80-90%)	<i>SOX11</i> ↓↓ (10-20%)	<i>SOX11</i> ↑↑ (100%)
CLINICA AGRESIVA	CLINICA INDOLENTE	CLINICA AGRESIVA

CONCLUSIONES

1. *SOX11* es un biomarcador útil para identificar los MCL ciclina D1 negativos, aunque también puede ser detectado en algunos BL, LBL y T-PLL. Sin embargo, las diferencias morfológicas y fenotípicas de estos tumores no plantean problemas de diagnóstico diferencial con los MCL ciclina D1 negativos.
2. Los casos de MCL ciclina D1 negativos tienen características clínicas y patológicas similares a los MCL ciclina D1 positivos. Además, el perfil de alteraciones genómicas es también similar entre ambos grupos. Las alteraciones más frecuentes del subgrupo de MCL ciclina D1 negativo son las pérdidas de 1p, 6q, 9p, 11q, 13q y 17p, y las ganancias de 3q, 8q y 18q.
3. En los MCL ciclina D1 negativos, el gen de *CCND2* se encuentra frecuentemente translocado (55%) con genes *IG* de cadena ligera principalmente y muestra una sobreexpresión significativa de la ciclina D2. El 45% restante no presenta translocaciones de *CCND2* o *CCND3*, y tampoco muestra mutaciones en el residuo P281R de fosforilación como mecanismo alternativo a la translocación.
4. La frecuencia de deleciones de los genes frecuentemente alterados en MCL como *TP53*, *CDKN2A*, y *ATM* es similar entre los MCL ciclina D1 positivos y negativos. Dentro de los MCL ciclina D1 negativos, la pérdida de *ATM* es significativamente más frecuente en casos sin reordenamientos de *CCND2*. En cambio, las pérdidas de *TP53* son más frecuentes en casos con translocaciones en *CCND2*.
5. Las translocaciones de *CCND2* junto con la expresión de *SOX11* pueden ser herramientas de diagnóstico muy útiles en la identificación de los MCL ciclina D1 negativos para que estos pacientes puedan beneficiarse de los mismos protocolos terapéuticos usados en los MCL convencionales.
6. El análisis mediante qRT-PCR de los genes *SOX11*, *HDGFRP3* y *DBN1* permite la segregación en dos grupos moleculares de MCL leucémico que se asocian con la evolución de la enfermedad y la supervivencia.
7. Los niveles de expresión de *SOX11*, *HDGFRP3* y *DBN1* se mantienen estables en el transcurso de la enfermedad del MCL.
8. El subgrupo con baja expresión de los tres genes mencionados incluye los tumores con clínica indolente, afectación predominantemente no-ganglionar, genes de las inmunoglobulinas hipermutados, y una supervivencia significativamente superior en comparación a los casos con expresión alta.
9. Los MCL leucémicos con baja expresión de *SOX11*, *HDGFRP3* y *DBN1* y sin afectación ganglionar tienen una supervivencia significativamente superior a los pacientes con firma de expresión baja pero con afectación ganglionar.

-
10. Tanto los MCL con alta o baja expresión de los tres genes de la firma tienen una supervivencia significativamente inferior si presentan alteraciones en 17p, por lo que estado de 17p/*TP53* podría ser indicativo de la transformación neoplásica a formas más agresivas en pacientes que inicialmente presentan buen pronóstico.
 11. La evaluación de la firma de los tres genes (*SOX11*, *HDGFRP3* y *DBN1*) junto con el estudio de 17p/*TP53* en muestras leucémicas puede ayudar a identificar un subgrupo particular de MCL y determinar la evolución de los pacientes, respectivamente.

ANEXOS

Anexo 1. Cancer Res. 2010 Feb 70(4):1408-18.

Genomic and gene expression profiling defines indolent forms of mantle cell lymphoma

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

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

Anexo 2. PLoS One. 2011 Jun;6(6):e21382.

Epigenetic Activation of SOX11 in Lymphoid Neoplasms by Histone Modifications

Maria Carmela Vegliante, **Cristina Royo**, Jara Palomero, Itziar Salaverria, Balazs Balint, Idoia Martín-Guerrero, Xabier Agirre, Amaia Lujambio, Julia Richter, Silvia Xargay-Torrent, Silvia Beà, Luis Hernandez, Anna Enjuanes, María José Calasanz, Andreas Rosenwald, German Ott, José Roman-Gomez, Felipe Prosper, Manel Esteller, Pedro Jares, Reiner Siebert, Elias Campo, José. Martín-Subero, Virginia Amador.

Recent studies have shown aberrant expression of *SOX11* in various types of aggressive B-cell neoplasms. To elucidate the molecular mechanisms leading to such deregulation, we performed a comprehensive *SOX11* gene expression and epigenetic study in stem cells, normal hematopoietic cells and different lymphoid neoplasms. We observed that *SOX11* expression is associated with unmethylated DNA and presence of activating histone marks (H3K9/14Ac and H3K4me3) in embryonic stem cells and some aggressive B-cell neoplasms. In contrast, adult stem cells, normal hematopoietic cells and other lymphoid neoplasms do not express *SOX11*. Such repression was associated with silencing histone marks H3K9me2 and H3K27me3. The *SOX11* promoter of non-malignant cells was consistently unmethylated whereas lymphoid neoplasms with silenced *SOX11* tended to acquire DNA hypermethylation. *SOX11* silencing in cell lines was reversed by the histone deacetylase inhibitor SAHA but not by the DNA methyltransferase inhibitor AZA. These data indicate that, although DNA hypermethylation of *SOX11* is frequent in lymphoid neoplasms, it seems to be functionally inert, as *SOX11* is already silenced in the hematopoietic system. In contrast, the pathogenic role of *SOX11* is associated with its de novo expression in some aggressive lymphoid malignancies, which is mediated by a shift from inactivating to activating histone modifications.

Anexo 3. Haematologica. 2012 Feb;97(2):270-8.

In situ mantle cell lymphoma: clinical implications of an incidental finding with indolent clinical behavior.

Carvajal-Cuenca A, Sua LF, Silva NM, Pittaluga S, **Royo C**, Song JY, Sargent RL, Espinet B, Climent F, Jacobs SA, Delabie J, Naresh KN, Bagg A, Brousset P, Warnke RA, Serrano S, Harris NL, Swerdlow SH, Jaffe ES, Campo E.

BACKGROUND: Cyclin D1-positive B cells are occasionally found in the mantle zones of reactive lymphoid follicles, a condition that has been called "in situ mantle cell lymphoma". The clinical significance of this lesion remains uncertain.

DESIGN AND METHODS: The clinical and pathological characteristics, including SOX11 expression, of 23 cases initially diagnosed as in situ mantle cell lymphoma were studied.

RESULTS: Seventeen of the 23 cases fulfilled the criteria for in situ mantle cell lymphoma. In most cases, the lesions were incidental findings in reactive lymph nodes. The t(11;14) was detected in all eight cases examined. SOX11 was positive in seven of 16 cases (44%). Five cases were associated with other small B-cell lymphomas. In two cases, both SOX11-positive, the in situ mantle cell lymphoma lesions were discovered after the diagnosis of overt lymphoma; one 4 years earlier, and one 3 years later. Twelve of the remaining 15 patients had a follow-up of at least 1 year (median 2 years; range, 1-19.5), of whom 11 showed no evidence of progression, including seven who were not treated. Only one of 12 patients with an in situ mantle cell lymphoma lesion and no diagnosis of mantle cell lymphoma at the time developed an overt lymphoma, 4 years later; this case was also SOX11-positive. The six remaining cases were diagnosed as mantle cell lymphoma with a mantle zone pattern. Five were SOX11-positive and four of them were associated with lymphoma without a mantle zone pattern.

CONCLUSIONS: In situ mantle cell lymphoma lesions are usually an incidental finding with a very indolent behavior. These cases must be distinguished from mantle cell lymphoma with a mantle zone pattern and overt mantle cell lymphoma because they may not require therapeutic intervention.

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

Navarro A, Clot G, **Royo C**, Jares P, Hadzidimitriou A, Agathangelidis A, Bikos V, Darzentas N, Papadaki T, Salaverria I, Pinyol M, Puig X, Palomero J, Vegliante MC, Amador V, Martinez-Trillos A, Stefancikova L, Wiestner A, Wilson W, Pott C, Calasanz M, Trim N, Erber W, Sander B, Ott G, Rosenwald A, Colomer D, Giné E, Siebert R, López-Guillermo A, Stamatopoulos K, Beà S, Campo E.

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

Anexo 5. Semin Hematol. 2011 Jul;48(3):155-65. Review.

Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: new perspectives and challenges with clinical implications.

Navarro A, **Royo C**, Hernández L, Jares P, Campo E.

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

BIBLIOGRAFIA

- 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*. 403:503-11. 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*. 116:291-8. 2002.
- Angelopoulou MK, Siakantariz MP, Vassilakopoulos TP, Kontopidou FN, Rassidakis GZ, Dimopoulou MN, Kittas C, Pangalis GA. The splenic form of mantle cell lymphoma. *Eur J Haematol*. 68:12-21. 2002.
- Beà S, Ribas M, Hernández JM, Bosch F, Pinyol M, Hernández L, García JL, Flores T, González M, López-Guillermo A, Piris MA, Cardesa A, Montserrat E, Miró R, Campo E. Increased number of chromosomal imbalances and high-level DNA amplifications in mantle cell lymphoma are associated with blastoid variants. *Blood*. 93:4365-74. 1999.
- Beà S, Salaverria I, Armengol L, Pinyol M, Fernández V, Hartmann EM, Jares P, Amador V, Hernández L, Navarro A, Ott G, Rosenwald A, Estivill X, Campo E. Uniparental disomies, homozygous deletions, amplifications, and target genes in mantle cell lymphoma revealed by integrative high-resolution whole-genome profiling. *Blood*. 113:3059-69. 2009.
- Beà S, Tort F, Pinyol M, Puig X, Hernández L, Hernández 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*. 61:2409-12. 2001.
- Beà 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; Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project. Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene-expression-based survival prediction. *Blood*. 106:3183-90. 2005.
- Bentz M, Plesch A, Bullinger L, Stilgenbauer S, Ott G, Müller-Hermelink HK, Baudis M, Barth TF, Möller P, Lichter P, Döhner H. t(11;14)-positive mantle cell lymphomas exhibit complex karyotypes and share similarities with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 27:285-94. 2000.
- Bergsagel PL, Kuehl WM. Critical roles for immunoglobulin translocations and cyclin D dysregulation in multiple myeloma. *Immunol Rev*. 194:96-104. 2003.
- Bernardi R, Pandolfi PP. Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8:1006-16. 2007.

-
- Bhat KM, Setaluri V. Microtubule-associated proteins as targets in cancer chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 13:2849-54. 2007.
- Bodrug SE, Warner BJ, Bath ML, Lindeman GJ, Harris AW, Adams JM. Cyclin D1 transgene impedes lymphocyte maturation and collaborates in lymphomagenesis with the myc gene. *EMBO J.* 13:2124-30. 1994.
- Boer CJ, Kluin-Nelemans JC, Dreef E, Kester MG, Kluin PM, Schuurin E, van Krieken JH. Involvement of the CCND1 gene in hairy cell leukemia. *Ann Oncol.* 7:251-6. 1996.
- 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.* 15:1599-603. 1997.
- Bosch F, López-Guillermo A, Campo E, Ribera JM, Conde E, Piris MA, Vallespí T, Woessner S, Montserrat E. Mantle cell lymphoma: presenting features, response to therapy, and prognostic factors. *Cancer.* 82:567-75. 1998.
- Bruce S, Leinonen R, Lindgren CM, Kivinen K, Dahlman-Wright K, Lipsanen-Nyman M, Hannula-Jouppi K, Kere J. Global analysis of uniparental disomy using high density genotyping arrays. *J Med Genet.* 42:847-51. 2005.
- Brunning RD, Borowitz M, Matutes E, et al. Precursor B lymphoblastic leukaemia/lymphoma (precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia). In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, eds. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic Tissues.* Lyon, France: IARC Press. 111-114. 2001.
- Camacho FI, García JF, Cigudosa JC, Mollejo M, Algara P, Ruíz-Ballesteros E, Gonzalvo P, Martín P, Pérez-Seoane C, Sánchez-García J, Piris MA. Aberrant Bcl6 protein expression in mantle cell lymphoma. *Am J Surg Pathol.* 28:1051-6. 2004.
- Camacho E, Hernández L, Hernández S, Tort F, Bellosillo B, Beà S, Bosch F, Montserrat E, Cardesa A, Fernández 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.* 99:238-44. 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. 1999b.
- Campo E, Raffeld M, Jaffe ES. Mantle-cell lymphoma. *Semin Hematol.* 36:115-27. 1999a.
- Carvajal-Cuenca A, Sua LF, Silva NM, Pittaluga S, Royo C, Song JY, Sargent RL, Espinet B, Climent F, Jacobs SA, Delabie J, Naresh KN, Bagg A, Brousset P, Warnke RA, Serrano S, Harris NL, Swerdlow SH, Jaffe ES, Campo E. In situ mantle cell lymphoma: clinical implications of an incidental finding with indolent clinical behavior. *Haematologica.* 97:270-8. 2012.
- Chen YH, Gao J, Fan G, Peterson LC. Nuclear expression of SOX11 is highly associated with mantle cell lymphoma but is independent of t(11;14)(q13;q32) in non-mantle cell B-cell neoplasms. *Mod Pathol.* 23:105-12. 2010.

- Christian B, Zhao W, Hamadani M, Sotomayor EM, Navarro W, Devine SM, Racke F, Blum KA. Mantle cell lymphoma 12 years after allogeneic bone marrow transplantation occurring simultaneously in recipient and donor. *J Clin Oncol.* 28:e629-32. 2010.
- Coller HA. What's taking so long? S-phase entry from quiescence versus proliferation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:667-70. 2007.
- Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, Marcé S, López-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.* 348:1764-75. 2003.
- Dictor M, Ek S, Sundberg M, Warenholt J, György C, Sernbo S, Gustavsson E, Abu-Alsoud W, Wadström T, Borrebaeck C. Strong lymphoid nuclear expression of SOX11 transcription factor defines lymphoblastic neoplasms, mantle cell lymphoma and Burkitt's lymphoma. *Haematologica.* 94:1563-8. 2009.
- Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, Döhner K, Bentz M, Lichter P. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 343:1910-6. 2000.
- Dreyling M, Kluin-Nelemans HC, Beà S, Hartmann E, Salaverria I, Hutter G, Perez-Galan P, Roue G, Pott C, Le Gouill S, Cortelazzo S, Rule S, Hess G, Zaja F, Vitolo U, Szymczyk M, Walewski J, Ribrag V, Unterhalt M, Hermine O, Hoster E; European Mantle Cell Lymphoma Network. Update on the molecular pathogenesis and clinical treatment of mantle cell lymphoma: report of the 10th annual conference of the European Mantle Cell Lymphoma Network. *Leuk Lymphoma.* 52:2226-36. 2011.
- Dreyling M, Lenz G, Hoster E, Van Hoof A, Gisselbrecht C, Schmits R, Metzner B, Truemper L, Reiser M, Steinhauer H, Boiron JM, Boogaerts MA, Aldaoud A, Silingardi V, Kluin-Nelemans HC, Hasford J, Parwaresch R, Unterhalt M, Hiddemann W. Early consolidation by myeloablative radiochemotherapy followed by autologous stem cell transplantation in first remission significantly prolongs progression-free survival in mantle-cell lymphoma: results of a prospective randomized trial of the European MCL Network. *Blood.* 105:2677-84. 2005.
- Dy P, Penzo-Méndez A, Wang H, Pedraza CE, Macklin WB, Lefebvre V. The three SOX C proteins-SOX4, SOX11 and SOX12-exhibit overlapping expression patterns and molecular properties. *Nucleic Acids Res.* 36:3101-17. 2008.
- Ek S, Dictor M, Jerkeman M, Jirström K, Borrebaeck CA. Nuclear expression of the non B-cell lineage *SOX11* transcription factor identifies mantle cell lymphoma. *Blood.* 111:800-5. 2008.
- Espinete B, Salaverria I, Beà S, Ruiz-Xivillé N, Balagué O, Salido M, Costa D, Carreras J, Rodríguez-Vicente AE, Luís García J, Hernández-Rivas JM, Calasanz MJ, Siebert R, Ferrer A, Salar A, Carrió A, Polo N, García-Marco JA, Domingo A, González-Barca E, Romagosa V, Marugán I, López-Guillermo A, Millá F, Luís Mate J, Luño E, Sanzo C, Collado R, Oliver I, Monzó S, Palacín A, González T, Sant F, Salinas R, Ardanaz MT, Font L, Escoda L, Florensa L, Serrano S, Campo E, Solé F. Incidence and prognostic impact of secondary cytogenetic aberrations

-
- in a series of 145 patients with mantle cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 49:439-51. 2010.
- Espinete B, Solé F, Pedro C, Garcia M, Bellosillo B, Salido M, Florensa L, Camacho FI, Baró 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.* 36:1232-7. 2005.
- Eve HE, Furtado MV, Hamon MD, Rule SA. Time to treatment does not influence overall survival in newly diagnosed mantle-cell lymphoma. *J Clin Oncol.* 27:e189-90. 2009.
- Fernández V, Salameró O, Espinete B, Solé F, Royo C, Navarro A, Camacho F, Beà S, Hartmann E, Amador V, Hernández L, Agostinelli C, Sargent RL, Rozman M, Aymerich M, Colomer D, Villamor N, Swerdlow SH, Pileri SA, Bosch F, Piris MA, Montserrat E, Ott G, Rosenwald A, López-Guillermo A, Jares P, Serrano S, Campo E. Genomic and gene expression profiling defines indolent forms of mantle cell lymphoma. *Cancer Res.* 70:1408-18. 2010.
- Ferrer A, Salaverria I, Bosch F, Villamor N, Rozman M, Beà S, Giné E, López-Guillermo A, Campo E, Montserrat E. Leukemic involvement is a common feature in mantle cell lymphoma. *Cancer.* 109:2473-80. 2007.
- Flordal Thelander E, Ichimura K, Collins VP, Walsh SH, Barbany G, Hagberg A, Laurell A, Rosenquist R, Larsson C, Lagercrantz S. Detailed assessment of copy number alterations revealing homozygous deletions in 1p and 13q in mantle cell lymphoma. *Leuk Res.* 31:1219-30. 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, Rimsza L, Braziel RM, Müller-Hermelink HK, Campo E, Gascoyne RD, Staudt LM, Chan WC; Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project. Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study based on gene expression profiling. *Blood.* 106:4315-21. 2005.
- Geisler CH, Kolstad A, Laurell A, Rätty R, Jerkeman M, Eriksson M, Nordström M, Kimby E, Boesen AM, Nilsson-Ehle H, Kuittinen O, Lauritzen GF, Ralfkiaer E, Ehinger M, Sundström C, Delabie J, Karjalainen-Lindsberg ML, Brown P, Elonen E; Nordic Lymphoma Group. The Mantle Cell Lymphoma International Prognostic Index (MIPI) is superior to the International Prognostic Index (IPI) in predicting survival following intensive first-line immunochemotherapy and autologous stem cell transplantation (ASCT). *Blood.* 115:1530-3. 2010.
- Gesk S, Klapper W, Martín-Subero JI, Nagel I, Harder L, Fu K, Bernd HW, Weisenburger DD, Parwaresch R, Siebert R. A chromosomal translocation in cyclin D1-negative/cyclin D2-positive mantle cell lymphoma fuses the *CCND2* gene to the IGK locus. *Blood.* 108:1109-10. 2006 Gradowski JF, Sargent RL, Craig FE, Cieply K, Fuhrer K, Sherer C, Swerdlow SH. Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma with cyclin D1 positive proliferation centers do not have *CCND1* translocations or gains and lack *SOX11* expression. *Am J Clin Pathol.* 138:132-9. 2012.

- Greiner TC, Dasgupta C, Ho VV, Weisenburger DD, Smith LM, Lynch JC, Vose JM, Fu K, Armitage JO, Braziel 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.* 103:2352-7. 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.* 87:4302-10. 1996.
- Gruszka-Westwood AM, Atkinson S, Summersgill BM, Shipley J, Elnenaie 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.* 33:206-12. 2002.
- Halldórsdóttir AM, Sander B, Göransson H, Isaksson A, Kimby E, Mansouri M, Rosenquist R, Ehrencrona H. High-resolution genomic screening in mantle cell lymphoma--specific changes correlate with genomic complexity, the proliferation signature and survival. *Genes Chromosomes Cancer.* 50:113-21. 2011.
- Hartmann EM, Campo E, Wright G, Lenz G, Salaverria I, Jares P, Xiao W, Braziel RM, Rimsza LM, Chan WC, Weisenburger DD, Delabie J, Jaffe ES, Gascoyne RD, Dave SS, Mueller-Hermelink HK, Staudt LM, Ott G, Beà S, Rosenwald A. Pathway discovery in mantle cell lymphoma by integrated analysis of high-resolution gene expression and copy number profiling. *Blood.* 116:953-61. 2010.
- Herens C, Lambert F, Quintanilla-Martinez L, Bisig B, Deusings C, de Leval L. Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma with cryptic t(12;14)(p13;q32) and cyclin D2 overexpression. *Blood.* 111:1745-6. 2008.
- Hernández L, Beà S, Pinyol M, Ott G, Katzenberger T, Rosenwald A, Bosch F, López-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.* 65:2199-206. 2005.
- Hernández L, Fest T, Cazorla M, Teruya-Feldstein J, Bosch F, Peinado MA, Piris MA, Montserrat E, Cardesa A, Jaffe ES, Campo E, Raffeld M. p53 gene mutations and protein overexpression are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas. *Blood.* 87:3351-9. 1996.
- Hernández L, Hernández S, Beà S, Pinyol M, Ferrer A, Bosch F, Nadal A, Fernández PL, Palacín A, Montserrat E, Campo E. c-myc mRNA expression and genomic alterations in mantle cell lymphomas and other nodal non-Hodgkin's lymphomas. *Leukemia.* 13:2087-93. 1999.
- Herrmann A, Hoster E, Zwingers T, Brittinger G, Engelhard M, Meusers P, Reiser M, Forstpointner R, Metzner B, Peter N, Wörmann B, Trümper L, Pfreundschuh M, Einsele H, Hiddemann W, Unterhalt M, Dreyling M. Improvement of overall survival in advanced stage mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol.* 27:511-8. 2009.

-
- Honma K, Tsuzuki S, Nakagawa M, Tagawa H, Nakamura S, Morishima Y, Seto M. TNFAIP3/A20 functions as a novel tumor suppressor gene in several subtypes of non-Hodgkin lymphomas. *Blood*. 114:2467-75. 2009.
- Hoster E, Dreyling M, Klapper W, Gisselbrecht C, van Hoof A, Kluin-Nelemans HC, Pfreundschuh M, Reiser M, Metzner B, Einsele H, Peter N, Jung W, Wörmann B, Ludwig WD, Dührsen U, Eimermacher H, Wandt H, Hasford J, Hiddemann W, Unterhalt M; German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG); European Mantle Cell Lymphoma Network. A new prognostic index (MIPI) for patients with advanced-stage mantle cell lymphoma. *Blood*. 111:558-65. (Erratum in: *Blood*. 111:5761. 2008). 2008.
- Ioachim HL, Medeiros LJ. *Lymph Node Pathology* (2009). Fourth edition. Philadelphia.
- Isaacson PG, Wotherspoon AC, Diss T, Pan LX. Follicular colonization in B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *Am J Surg Pathol*. 15:819-28. 1991.
- Jankowski MP, Cornuet PK, McIlwrath S, Koerber HR, Albers KM. SRY-box containing gene 11 (Sox11) transcription factor is required for neuron survival and neurite growth. *Neuroscience*. 143:501-14. 2006.
- Jares P, Colomer D, Campo E. Genetic and molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: perspectives for new targeted therapeutics. *Nat Rev Cancer*. 7:750-62. 2007.
- Jarosová M, Papajík T, Holzerová M, Dusek L, Pikalová Z, Lakomá I, Raida L, Faber E, Divoká M, Vlachová S, Prekopová I, Novosadová A, Pospíšilová H, Indrák K. High incidence of unbalanced chromosomal changes in mantle cell lymphoma detected by comparative genomic hybridization. *Leuk Lymphoma*. 45:1835-46. 2004.
- Jay P, Gozé C, Marsollier C, Taviaux S, Hardelin JP, Koopman P, Berta P. The human *SOX11* gene: cloning, chromosomal assignment and tissue expression. *Genomics*. 29:541-5. 1995.
- Katzenberger T, Kienle D, Stilgenbauer S, Höller S, Schilling C, Mäder U, Puppe B, Petzoldt C, Sander S, Bullinger L, Stöcklein H, Kalla J, Hartmann E, Adam P, Ott MM, Müller-Hermelink HK, Rosenwald A, Ott G. Delineation of distinct tumour profiles in mantle cell lymphoma by detailed cytogenetic, interphase genetic and morphological analysis. *Br J Haematol*. 142:538-50. 2008.
- Katzenberger T, Petzoldt C, Höller S, Mäder U, Kalla J, Adam P, Ott MM, Müller-Hermelink HK, Rosenwald A, Ott G. The Ki67 proliferation index is a quantitative indicator of clinical risk in mantle cell lymphoma. *Blood*. 107:3407. 2006.
- Kawamata N, Ogawa S, Gueller S, Ross SH, Huynh T, Chen J, Chang A, Nabavi-Nouis S, Megrabian N, Siebert R, Martinez-Climent JA, Koeffler HP. Identified hidden genomic changes in mantle cell lymphoma using high-resolution single nucleotide polymorphism genomic array. *Exp Hematol*. 37:937-46. 2009.
- Kiefer JC. Back to basics: Sox genes. *Dev Dyn*. 236:2356-66. 2007.
- Kimura Y, Sato K, Imamura Y, Arakawa F, Kiyasu J, Takeuchi M, Miyoshi H, Yoshida M, Niino D, Sugita Y, Morito T, Yoshino T, Nakamura S, Ohshima K. Small cell variant of mantle cell

- lymphoma is an indolent lymphoma characterized by bone marrow involvement, splenomegaly, and a low Ki-67 index. *Cancer Sci.*102:1734-41. 2011.
- Klein B, Seckinger A, Moehler T, Hose D. Molecular pathogenesis of multiple myeloma: chromosomal aberrations, changes in gene expression, cytokine networks, and the bone marrow microenvironment. *Recent Results Cancer Res.* 183:39-86. 2011.
- Kohlhammer H, Schwaenen C, Wessendorf S, Holzmann K, Kestler HA, Kienle D, Barth TF, Möller P, Ott G, Kalla J, Radlwimmer B, Pscherer A, Stilgenbauer S, Döhner 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, Iida 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.* 84:1226-31. 1994.
- Kotake Y, Zeng Y, Xiong Y. DDB1-CUL4 and MLL1 mediate oncogene-induced p16INK4a activation. *Cancer Res.* 69:1809-14. 2009.
- Kröber A, Seiler T, Benner A, Bullinger L, Brückle E, Lichter P, Döhner H, Stilgenbauer S. V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 100:1410-6. 2002.
- Kröber A, Bloehdorn J, Hafner S, Bühler A, Seiler T, Kienle D, Winkler D, Bangerter M, Schlenk RF, Benner A, Lichter P, Döhner H, Stilgenbauer S. Additional genetic high-risk features such as 11q deletion, 17p deletion, and V3-21 usage characterize discordance of ZAP-70 and VH mutation status in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol.* 24:969-75. 2006.
- Laerm A, Helmbold P, Goldberg M, Dammann R, Holzhausen HJ, Ballhausen WG. Prospero-related homeobox 1 (PROX1) is frequently inactivated by genomic deletions and epigenetic silencing in carcinomas of the biliary system. *J Hepatol.* 46:89-97. 2007.
- Lecluse Y, Lebailly P, Roulland S, Gac AC, Nadel B, Gauduchon P. t(11;14)-positive clones can persist over a long period of time in the peripheral blood of healthy individuals. *Leukemia.* 23:1190-3. 2009.
- Lee CJ, Appleby VJ, Orme AT, Chan WI, Scotting PJ. Differential expression of SOX4 and SOX11 in medulloblastoma. *J Neurooncol.* 57:201-14. 2002.
- Lefebvre V, Dumitriu B, Penzo-Méndez A, Han Y, Pallavi B. Control of cell fate and differentiation by Sry-related high-mobility-group box (Sox) transcription factors. *Int J Biochem Cell Biol.* 39:2195-214. 2007.
- Leich E, Salaverria I, Bea S, Zettl A, Wright G, Moreno V, Gascoyne RD, Chan WC, Braziel RM, Rimsza LM, Weisenburger DD, Delabie J, Jaffe ES, Lister A, Fitzgibbon J, Staudt LM, Hartmann EM, Mueller-Hermelink HK, Campo E, Ott G, Rosenwald A. Follicular lymphomas with and without translocation t(14;18) differ in gene expression profiles and genetic alterations. *Blood.* 114:826-34. 2009.

-
- Lin P, Jones D, Dorfman DM, Medeiros LJ. Precursor B-cell lymphoblastic lymphoma: a predominantly extranodal tumor with low propensity for leukemic involvement. *Am J Surg Pathol.* 24:1480-90. 2000.
- Liu SY, Chen YT, Tseng MY, Hung CC, Chiang WF, Chen HR, Shieh TY, Chen CH, Jou YS, Chen JY. Involvement of microtubule-associated protein 2 (MAP2) in oral cancer cell motility: a novel biological function of MAP2 in non-neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 366:520-5. 2008.
- Lovec H, Grzeschiczek A, Kowalski MB, Möröy T. Cyclin D1/bcl-1 cooperates with myc genes in the generation of B-cell lymphoma in transgenic mice. *EMBO J.* 13:3487-95. 1994.
- Marcé S, Balagué O, Colomo L, Martinez A, Höller S, Villamor N, Bosch F, Ott G, Rosenwald A, Leoni L, Esteller M, Fraga MF, Montserrat E, Colomer D, Campo E. Lack of methylthioadenosine phosphorylase expression in mantle cell lymphoma is associated with shorter survival: implications for a potential targeted therapy. *Clin Cancer Res.* 12:3754-61. 2006.
- Martin P, Chadburn A, Christos P, Furman R, Ruan J, Joyce MA, Fusco E, Glynn P, Elstrom R, Niesvizky R, Feldman EJ, Shore TB, Schuster MW, Ely S, Knowles DM, Chen-Kiang S, Coleman M, Leonard JP. Intensive treatment strategies may not provide superior outcomes in mantle cell lymphoma: overall survival exceeding 7 years with standard therapies. *Ann Oncol.* 19:1327-30. 2008.
- Martin P, Chadburn A, Christos P, Weil K, Furman RR, Ruan J, Elstrom R, Niesvizky R, Ely S, Diliberto M, Melnick A, Knowles DM, Chen-Kiang S, Coleman M, Leonard JP. Outcome of deferred initial therapy in mantle-cell lymphoma. *J Clin Oncol.* 27:1209-13. 2009.
- Martin P, Leonard J. Is there a role for "watch and wait" in patients with mantle cell lymphoma? *Semin Hematol.* 48:189-93. 2011.
- Martinez-Climent JA, Vizcarra E, Sanchez D, Blesa D, Marugan I, Benet I, Sole F, Rubio-Moscardo F, Terol MJ, Climent J, Sarsotti E, Tormo M, Andreu E, Salido M, Ruiz MA, Prosper F, Siebert R, Dyer MJ, García-Conde J. Loss of a novel tumor suppressor gene locus at chromosome 8p is associated with leukemic mantle cell lymphoma. *Blood.* 98:3479-82. 2001.
- 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.
- Muñoz A. *Cáncer. Genes y Nuevas Terapias.* 1997.
- Nagai H, Li Y, Hatano S, Toshihito O, Yuge M, Ito E, Utsumi M, Saito H, Kinoshita T. Mutations and aberrant DNA methylation of the PROX1 gene in hematologic malignancies. *Genes Chromosomes Cancer.* 38:13-21. 2003.
- Nagel I, Szczepanowski M, Martín-Subero JI, Harder L, Akasaka T, Ammerpohl O, Callet-Bauchu E, Gascoyne RD, Gesk S, Horsman D, Klapper W, Majid A, Martinez-Climent JA, Stilgenbauer S, Tönnies H, Dyer MJ, Siebert R. Deregulation of the telomerase reverse

- transcriptase (TERT) gene by chromosomal translocations in B-cell malignancies. *Blood*. 116:1317-20. 2010.
- Navarro A, Beà S, Fernández V, Prieto M, Salaverria I, Jares P, Hartmann E, Mozos A, López-Guillermo A, Villamor N, Colomer D, Puig X, Ott G, Solé F, Serrano S, Rosenwald A, Campo E, Hernández L. MicroRNA expression, chromosomal alterations, and immunoglobulin variable heavy chain hypermutations in Mantle cell lymphomas. *Cancer Res*. 69:7071-8. 2009.
- Nieländer I, Bug S, Richter J, Giefing M, Martín-Subero JI, Siebert R. Combining array-based approaches for the identification of candidate tumor suppressor loci in mature lymphoid neoplasms. *APMIS*. 115:1107-34. 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*. 34:1030-4. 2003.
- Novara F, Beri S, Bernardo ME, Bellazzi R, Malovini A, Ciccone R, Cometa AM, Locatelli F, Giorda R, Zuffardi O. Different molecular mechanisms causing 9p21 deletions in acute lymphoblastic leukemia of childhood. *Hum Genet*. 126:511-20. 2009.
- Nygren L, Baumgartner Wennerholm S, Klimkowska M, Christensson B, Kimby E, Sander B. Prognostic role of SOX11 in a population-based cohort of mantle cell lymphoma. *Blood*. 119:4215-23. 2012.
- Olive V, Jiang I, He L. mir-17-92, a cluster of miRNAs in the midst of the cancer network. *Int J Biochem Cell Biol*. 42:1348-54. 2010.
- Oliveira MS, Jaffe ES, Catovsky D. Leukaemic phase of mantle zone (intermediate) lymphoma: its characterisation in 11 cases. *J Clin Pathol*. 42:962-72. 1989.
- Ondrejka SL, Lai R, Smith SD, Hsi ED. Indolent mantle cell leukemia: a clinicopathological variant characterized by isolated lymphocytosis, interstitial bone marrow involvement, kappa light chain restriction, and good prognosis. *Haematologica*. 96:1121-7. 2011.
- 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*. 101:4975-81. 2003.
- Ott G, Katzenberger T, Greiner A, Kalla J, Rosenwald A, Heinrich U, Ott MM, Müller-Hermelink HK. The t(11;18)(q21;q21) chromosome translocation is a frequent and specific aberration in low-grade but not high-grade malignant non-Hodgkin's lymphomas of the mucosa-associated lymphoid tissue (MALT-) type. *Cancer Res*. 57:3944-8. 1997.
- Park MY, Moon JH, Lee KS, Choi HI, Chung J, Hong HJ, Kim E. FAF1 suppresses I κ B kinase (IKK) activation by disrupting the IKK complex assembly. *J Biol Chem*. 282:27572-7. 2007.
- Parry-Jones N, Matutes E, Morilla R, Brito-Babapulle V, Wotherspoon A, Swansbury GJ, Catovsky D. Cytogenetic abnormalities additional to t(11;14) correlate with clinical features in

-
- leukaemic presentation of mantle cell lymphoma, and may influence prognosis: a study of 60 cases by FISH. *Br J Haematol.* 137:117-24. 2007.
- Pasqualucci L, Trifonov V, Fabbri G, Ma J, Rossi D, Chiarenza A, Wells VA, Grunn A, Messina M, Elliot O, Chan J, Bhagat G, Chadburn A, Gaidano G, Mullighan CG, Rabadan R, Dalla-Favera R. Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nat Genet.* 43:830-7. 2011.
- Penzo-Méndez AI. Critical roles for SoxC transcription factors in development and cancer. *Int J Biochem Cell Biol.* 42:425-8. 2010.
- Pérez-Galán P, Dreyling M, Wiestner A. Mantle cell lymphoma: biology, pathogenesis, and the molecular basis of treatment in the genomic era. *Blood.* 117:26-38. 2011.
- Pinyol M, Beà S, Plà 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.* 109:5422-9. 2007.
- Pinyol M, Hernandez L, Cazorla M, Balbín M, Jares P, Fernandez PL, Montserrat E, Cardesa A, Lopez-Otín C, Campo E. Deletions and loss of expression of p16INK4a and p21Waf1 genes are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas. *Blood.* 89:272-80. 1997.
- Psyri A, Papageorgiou S, Liakata E, Scorilas A, Rontogianni D, Kontos CK, Argyriou P, Pectasides D, Harhalakis N, Pappa V, Kolialexi A, Economopoulou C, Kotsioti F, Maratou E, Dimitriadis G, Economopoulou P, Economopoulos T. Phosphatidylinositol 3'-kinase catalytic subunit alpha gene amplification contributes to the pathogenesis of mantle cell lymphoma. *Clin Cancer Res.* 15:5724-32. 2009.
- Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordóñez GR, Villamor N, Escaramis G, Jares P, Beà S, González-Díaz M, Bassaganyas L, Baumann T, Juan M, López-Guerra M, Colomer D, Tubío JM, López C, Navarro A, Tornador C, Aymerich M, Rozman M, Hernández JM, Puente DA, Freije JM, Velasco G, Gutiérrez-Fernández A, Costa D, Carrió A, Guijarro S, Enjuanes A, Hernández L, Yagüe J, Nicolás P, Romeo-Casabona CM, Himmelbauer H, Castillo E, Dohm JC, de Sanjosé S, Piris MA, de Alava E, San Miguel J, Royo R, Gelpí JL, Torrents D, Orozco M, Pisano DG, Valencia A, Guigó R, Bayés M, Heath S, Gut M, Klatt P, Marshall J, Raine K, Stebbings LA, Futreal PA, Stratton MR, Campbell PJ, Gut I, López-Guillermo A, Estivill X, Montserrat E, López-Otín C, Campo E. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature.* 475:101-5. 2011.
- Quintanilla-Martinez L, Slotta-Huspenina J, Koch I, Klier M, Hsi ED, de Leval L, Klapper W, Gesk S, Siebert R, Fend F. Differential diagnosis of cyclin D2+ mantle cell lymphoma based on fluorescence in situ hybridization and quantitative real-time-PCR. *Haematologica.* 94:1595-8. 2009.
- Racke F, Simpson S, Christian B, Blum K, Hasserjian R, Zhao W. Evidence of long latency periods to development of mantle cell lymphoma. 52nd ASH Annual Meeting and Exposition. Orlando, FL. December 4-7, 2010.

- Räty R, Franssila K, Joensuu H, Teerenhovi L, Elonen E. Ki-67 expression level, histological subtype, and the International Prognostic Index as outcome predictors in mantle cell lymphoma. *Eur J Haematol.* 69:11-20. 2002.
- Richard P, Vassallo J, Valmary S, Missouri R, Delsol G, Brousset P. "In situ-like" mantle cell lymphoma: a report of two cases. *J Clin Pathol.* 59:995-6. 2006.
- Rimokh R, Berger F, Bastard C, Klein B, French M, Archimbaud E, Rouault JP, Santa Lucia B, Duret L, Vuillaume M, et al. Rearrangement of *CCND1* (*BCL1/PRAD1*) 3' untranslated region in mantle-cell lymphomas and t(11q13)-associated leukemias. *Blood.* 83:3689-96. 1994.
- 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.* 132:303-16. 2006.
- Rocha CK, Praulich I, Gehrke I, Hallek M, Kreuzer KA. A rare case of t(11;22) in a mantle cell lymphoma like B-cell neoplasia resulting in a fusion of IGL and *CCND1*: case report. *Mol Cytogenet.* 4:8. 2011.
- Roix JJ, McQueen PG, Munson PJ, Parada LA, Misteli T. Spatial proximity of translocation-prone gene loci in human lymphomas. *Nat Genet.* 34:287-91. 2003.
- Romaguera JE, Fayad LE, Feng L, Hartig K, Weaver P, Rodriguez MA, Hagemester FB, Pro B, McLaughlin P, Younes A, Samaniego F, Goy A, Cabanillas F, Kantarjian H, Kwak L, Wang M. Ten-year follow-up after intense chemoimmunotherapy with Rituximab-HyperCVAD alternating with Rituximab-high dose methotrexate/cytarabine (R-MA) and without stem cell transplantation in patients with untreated aggressive mantle cell lymphoma. *Br J Haematol.* 150:200-8 (Erratum in: *Br J Haematol* 151:111. 2010). 2010.
- Rosenwald A, Wright G, Wiestner A, Chan WC, Connors JM, Campo E, Gascoyne RD, Grogan TM, Muller-Hermelink HK, Smeland EB, Chiorazzi M, Giltner 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.* 3:185-97. 2003.
- Rubio-Moscardo F, Climent J, Siebert R, Piris MA, Martín-Subero JI, Nieländer I, Garcia-Conde J, Dyer MJ, Terol MJ, Pinkel D, Martínez-Climent JA. Mantle-cell lymphoma genotypes identified with CGH to BAC microarrays define a leukemic subgroup of disease and predict patient outcome. *Blood.* 105:4445-54. 2005.
- Rule SA, Poplar S, Evans PA, O'Connor SJ, Owen RG. Indolent mantle-cell lymphoma: immunoglobulin variable region heavy chain sequence analysis reveals evidence of disease 10 years prior to symptomatic clinical presentation. *J Clin Oncol.* 29:e437-9. 2011.

-
- Salaverria I, Espinet B, Carrió A, Costa D, Astier L, Slotta-Huspenina J, Quintanilla-Martinez L, Fend F, Solé F, Colomer D, Serrano S, Miró R, Beà S, Campo E. Multiple recurrent chromosomal breakpoints in mantle cell lymphoma revealed by a combination of molecular cytogenetic techniques. *Genes Chromosomes Cancer*. 47:1086-97. 2008a.
- Salaverria I, Zettl A, Beà S, Hartmann EM, Dave SS, Wright GW, Boerma EJ, Kluin PM, Ott G, Chan WC, Weisenburger DD, Lopez-Guillermo A, Gascoyne RD, Delabie J, Rimsza LM, Braziel RM, Jaffe ES, Staudt LM, Müller-Hermelink HK, Campo E, Rosenwald A; Leukemia and Lymphoma Molecular Profiling Project (LLMPP). Chromosomal alterations detected by comparative genomic hybridization in subgroups of gene expression-defined Burkitt's lymphoma. *Haematologica*. 93:1327-34. 2008b.
- Salaverria I, Zettl A, Beà S, Moreno V, Valls J, Hartmann E, Ott G, Wright G, Lopez-Guillermo A, Chan WC, Weisenburger DD, Gascoyne RD, Grogan TM, Delabie J, Jaffe ES, Montserrat E, Muller-Hermelink HK, Staudt LM, Rosenwald A, Campo E. Specific secondary genetic alterations in mantle cell lymphoma provide prognostic information independent of the gene expression-based proliferation signature. *J Clin Oncol*. 25:1216-22. 2007.
- Schaffner C, Idler I, Stilgenbauer S, Döhner H, Lichter P. Mantle cell lymphoma is characterized by inactivation of the ATM gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:2773-8. 2000.
- Schilham MW, Oosterwegel MA, Moerer P, Ya J, de Boer PA, van de Wetering M, Verbeek S, Lamers WH, Kruisbeek AM, Cumano A, Clevers H. Defects in cardiac outflow tract formation and pro-B-lymphocyte expansion in mice lacking Sox-4. *Nature*. 380:711-4. 1996.
- Schlette E, Fu K, Medeiros LJ. CD23 expression in mantle cell lymphoma: clinicopathologic features of 18 cases. *Am J Clin Pathol*. 120:760-6. 2003. Schulz H, Bohlius J, Skoetz N, Trelle S, Kober T, Reiser M, Dreyling M, Herold M, Schwarzer G, Hallek M, Engert A. Chemotherapy plus Rituximab versus chemotherapy alone for B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Cochrane Database Syst Rev*. CD003805. 2007.
- Schmitz R, Jhavar S, Xiao W, Liu X, Powell J, Wright GW, Chan WC, Jaffe ES, Gascoyne RD, Campo E, Rosenwald A, Ott G, Delabie J, Rimsza LM, Staudt LM. Recurrent oncogenic mutations in *CCND3* in aggressive lymphomas. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2011;118: Abstract 435.
- 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*. 105:1686-93. 2005.
- Schulz H, Rehwald U, Morschhauser F, Elter T, Driessen C, Rüdiger T, Borchmann P, Schnell R, Diehl V, Engert A, Reiser M. Rituximab in relapsed lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma: long-term results of a phase 2 trial by the German Hodgkin Lymphoma Study Group (GHSG). *Blood*. 111:109-11. 2008.

- Seto M, Yamamoto K, Iida S, Akao Y, Utsumi KR, Kubonishi I, Miyoshi I, Ohtsuki T, Yawata Y, Namba M, et al. Gene rearrangement and overexpression of PRAD1 in lymphoid malignancy with t(11;14)(q13;q32) translocation. *Oncogene*. 7:1401-6. 1992.
- Shah BD, Martin P, Sotomayor EM. Mantle cell lymphoma: a clinically heterogeneous disease in need of tailored approaches. *Cancer Control*. 19:227-35. 2012.
- Shiller SM, Zieske A, Holmes H 3rd, Feldman AL, Law ME, Saad R. CD5-positive, cyclinD1-negative mantle cell lymphoma with a translocation involving the *CCND2* gene and the IGL locus. *Cancer Genet*. 204:162-4. 2011.
- Shipp et al. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. 329:987-94. 1993.
- Slotta-Huspenina J, Koch I, de Leval L, Keller G, Klier M, Bink K, Kremer M, Raffeld M, Fend F, Quintanilla-Martinez L. The impact of cyclin D1 mRNA isoforms, morphology and p53 in mantle cell lymphoma: p53 alterations and blastoid morphology are strong predictors of a high proliferation index. *Haematologica*. 97:1422-30. 2012.
- Smedby KE, Hjalgrim H. Epidemiology and etiology of mantle cell lymphoma and other non-Hodgkin lymphoma subtypes. *Semin Cancer Biol*. 21:293-8. 2011.
- Sock E, Rettig SD, Enderich J, Bösl MR, Tamm ER, Wegner M. Gene targeting reveals a widespread role for the high-mobility-group transcription factor Sox11 in tissue remodeling. *Mol Cell Biol*. 24:6635-44. 2004.
- Solal-Céligny P, Roy P, Colombat P, White J, Armitage JO, Arranz-Saez R, Au WY, Bellei M, Brice P, Caballero D, Coiffier B, Conde-Garcia E, Doyen C, Federico M, Fisher RI, Garcia-Conde JF, Guglielmi C, Hagenbeek A, Haioun C, LeBlanc M, Lister AT, Lopez-Guillermo A, McLaughlin P, Milpied N, Morel P, Mounier N, Proctor SJ, Rohatiner A, Smith P, Soubeyran P, Tilly H, Vitolo U, Zinzani PL, Zucca E, Montserrat E. Follicular lymphoma international prognostic index. *Blood*. 104:1258-65. 2004.
- Stankiewicz P, Shaw CJ, Dapper JD, Wakui K, Shaffer LG, Withers M, Elizondo L, Park SS, Lupski JR. Genome architecture catalyzes nonrecurrent chromosomal rearrangements. *Am J Hum Genet*. 72:1101-16. 2003.
- Stephens PJ, McBride DJ, Lin ML, Varela I, Pleasance ED, Simpson JT, Stebbings LA, Leroy C, Edkins S, Mudie LJ, Greenman CD, Jia M, Latimer C, Teague JW, Lau KW, Burton J, Quail MA, Swerdlow H, Churcher C, Natrajan R, Sieuwerts AM, Martens JW, Silver DP, Langerød A, Russnes HE, Foekens JA, Reis-Filho JS, van 't Veer L, Richardson AL, Børresen-Dale AL, Campbell PJ, Futreal PA, Stratton MR. Complex landscapes of somatic rearrangement in human breast cancer genomes. *Nature*. 462:1005-10. 2009.
- Streubel B, Simonitsch-Klupp I, Müllauer L, Lamprecht A, Huber D, Siebert R, Stolte M, Trautinger F, Lukas J, Püspök A, Formanek M, Assanasen T, Müller-Hermelink HK, Cerroni L, Raderer M, Chott A. Variable frequencies of MALT lymphoma-associated genetic aberrations in MALT lymphomas of different sites. *Leukemia*. 18:1722-6. 2004.

-
- Streubel B, Vinatzer U, Lamprecht A, Raderer M, Chott A. T(3;14)(p14.1;q32) involving IGH and FOXP1 is a novel recurrent chromosomal aberration in MALT lymphoma. *Leukemia*. 19:652-8. 2005.
- Swerdlow SH, Campo E, Harrys NL, Jaffe E, Pileri S, Stein H, Thiele J, Vardiman J, & Eds. WHO Classification of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth Edition edn, Lyon. 2008.
- Tagawa H, Suguro M, Tsuzuki S, Matsuo K, Karnan S, Ohshima K, Okamoto M, Morishima Y, Nakamura S, Seto M. Comparison of genome profiles for identification of distinct subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 106:1770-7. (Erratum in: *Blood*. 2006. 107:3052.) 2005.
- 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*. 24:1348-58. 2005.
- Thoennissen NH, Krug UO, Lee DH, Kawamata N, Iwanski GB, Lasho T, Weiss T, Nowak D, Koren-Michowitz M, Kato M, Sanada M, Shih LY, Nagler A, Raynaud SD, Müller-Tidow C, Mesa R, Haferlach T, Gilliland DG, Tefferi A, Ogawa S, Koeffler HP. Prevalence and prognostic impact of allelic imbalances associated with leukemic transformation of Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 115:2882-90. 2010.
- Tiemann M, Schrader C, Klapper W, Dreyling MH, Campo E, Norton A, Berger F, Klün P, Ott G, Pileri S, Pedrinis E, Feller AC, Merz H, Janssen D, Hansmann ML, Krieken H, Möller P, Stein H, Unterhalt M, Hiddemann W, Parwaresch R; European MCL Network. 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, Hernández S, Beà S, Camacho E, Fernández V, Esteller M, Fraga MF, Burek C, Rosenwald A, Hernández L, Campo E. Checkpoint kinase 1 (CHK1) protein and mRNA expression is downregulated in aggressive variants of human lymphoid neoplasms. *Leukemia* 19:112-7. 2005.
- Tort F, Hernández S, Beà S, Martínez A, Esteller M, Herman JG, Puig X, Camacho E, Sánchez M, Nayach I, Lopez-Guillermo A, Fernández PL, Colomer D, Hernández L, Campo E. CHK2-decreased protein expression and infrequent genetic alterations mainly occur in aggressive types of non-Hodgkin lymphomas. *Blood*. 100:4602-8. 2002.
- Traverse-Glehen A, Baseggio L, Bauchu EC, Morel D, Gazzo S, Ffrench M, Verney A, Rolland D, Thieblemont C, Magaud JP, Salles G, Coiffier B, Berger F, Felman P. Splenic red pulp lymphoma with numerous basophilic villous lymphocytes: a distinct clinicopathologic and molecular entity? *Blood*. 111:2253-60. 2008.
- Vater I, Wagner F, Kreuz M, Berger H, Martín-Subero JI, Pott C, Martínez-Clement JA, Klapper W, Krause K, Dyer MJ, Gesk S, Harder L, Zamo A, Dreyling M, Hasenclever D, Arnold N, Siebert R. GeneChip analyses point to novel pathogenetic mechanisms in mantle cell lymphoma. *Br J Haematol*. 144:317-31. 2009.

- Vegliante MC, Royo C, Palomero J, Salaverria I, Balint B, Martín-Guerrero I, Agirre X, Lujambio A, Richter J, Xargay-Torrent S, Bea S, Hernandez L, Enjuanes A, Calasanz MJ, Rosenwald A, Ott G, Roman-Gomez J, Prosper F, Esteller M, Jares P, Siebert R, Campo E, Martín-Subero JI, Amador V. Epigenetic activation of SOX11 in lymphoid neoplasms by histone modifications. *PLoS One*. 6:e21382. 2011.
- Wang X, Asplund AC, Porwit A, Flygare J, Smith CI, Christensson B, Sander B. The subcellular Sox11 distribution pattern identifies subsets of mantle cell lymphoma: correlation to overall survival. *Br J Haematol*. 143:248-52. 2008.
- Wegner M. From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic Acids Res*. 27:1409-20. 1999.
- Weigle B, Ebner R, Temme A, Schwind S, Schmitz M, Kiessling A, Rieger MA, Schackert G, Schackert HK, Rieber EP. Highly specific overexpression of the transcription factor *SOX11* in human malignant gliomas. *Oncol Rep*. 13:139-44. 2005.
- Welzel N, Le T, Marculescu R, Mitterbauer G, Chott A, Pott C, Kneba M, Du MQ, Kusec R, Drach J, Raderer M, Mannhalter C, Lechner K, Nadel B, Jaeger U. Templated nucleotide addition and immunoglobulin JH-gene utilization in t(11;14) junctions: implications for the mechanism of translocation and the origin of mantle cell lymphoma. *Cancer Res*. 61:1629-36. 2001.
- Wessendorf S, Barth TF, Viardot A, Mueller A, Kestler HA, Kohlhammer H, Lichter P, Bentz M, Döhner H, Möller P, Schwaenen C. Further delineation of chromosomal consensus regions in primary mediastinal B-cell lymphomas: an analysis of 37 tumor samples using high-resolution genomic profiling (array-CGH). *Leukemia*. 21:2463-9. 2007.
- Wetering M, Oosterwegel M, van Norren K, Clevers H. Sox-4, an Sry-like HMG box protein, is a transcriptional activator in lymphocytes. *EMBO J*. 12:3847-54. 1993.
- 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. Point mutations and genomic deletions in *CCND1* create stable truncated cyclin D1 mRNAs that are associated with increased proliferation rate and shorter survival. *Blood*. 109:4599-606. 2007.
- Williams ME, Swerdlow SH, Meeker TC. Chromosome t(11;14)(q13;q32) breakpoints in centrocytic lymphoma are highly localized at the bcl-1 major translocation cluster. *Leukemia*. 7:1437-40. 1993.
- Willis TG, Jadayel DM, Du MQ, Peng H, Perry AR, Abdul-Rauf M, Price H, Karran L, Majekodunmi O, Wlodarska I, Pan L, Crook T, Hamoudi R, Isaacson PG, Dyer MJ. Bcl10 is involved in t(1;14)(p22;q32) of MALT B cell lymphoma and mutated in multiple tumor types. *Cell*. 96:35-45. 1999.
- Witzig TE. Current treatment approaches for mantle-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 23:6409-14. 2005.

-
- Wlodarska I, Dierickx D, Vanhentenrijk V, Van Roosbroeck K, Pospíšilová H, Minnei F, Verhoef G, Thomas J, Vandenberghe P, De Wolf-Peeters C. Translocations targeting *CCND2*, *CCND3*, and *MYCN* do occur in t(11;14)-negative mantle cell lymphomas. *Blood*. 111:5683-90. 2008.
- Wlodarska I, Meeus P, Stul M, Thienpont L, Wouters E, Marcelis L, Demuyneck H, Rummens JL, Madoe V, Hagemeijer A. Variant t(2;11)(p11;q13) associated with the *IgK-CCND1* rearrangement is a recurrent translocation in leukemic small-cell B-non-Hodgkin lymphoma. *Leukemia*. 18:1705-10. 2004.
- Wlodarska I, Pittaluga S, Hagemeijer A, De Wolf-Peeters C, Van Den Berghe H. Secondary chromosome changes in mantle cell lymphoma. *Haematologica*. 84:594-9. 1999..
- Zanetto U, Dong H, Huang Y, Zhang K, Narbaitz M, Sapia S, Kostopoulos I, Liu H, Du MQ, Bacon CM. Mantle cell lymphoma with aberrant expression of CD10. *Histopathology*. 53:20-9. 2008.
- Zeng Q, Hong W. The emerging role of the hippo pathway in cell contact inhibition, organ size control, and cancer development in mammals. *Cancer Cell*. 13:188-92. Review. 2008.
- Zeng W, Fu K, Quintanilla-Fend L, Lim M, Ondrejka S, Hsi ED. Cyclin D1-negative blastoid mantle cell lymphoma identified by *SOX11* expression. *Am J Surg Pathol*. 36:214-9. 2012.
- Zhang Y, Dai Y, Zheng T, Ma S. Risk Factors of Non-Hodgkin Lymphoma. *Expert Opin Med Diagn*. 5:539-550. 2011.
- Zhu Y, Hollmén J, Rätty R, Aalto Y, Nagy B, Elonen E, Kere J, Mannila H, Franssila K, Knuutila S. Investigatory and analytical approaches to differential gene expression profiling in mantle cell lymphoma. *Br J Haematol*. 119:905-15. 2002.

GLOSARIO

Amplificación: es el fragmento de DNA formado por el producto de un evento de amplificación.

Anillo de Waldeyer: es un conjunto de estructuras compuestas por tejido linfóide situadas en la faringe, cuya función es la protección y defensa de la entrada de patógenos que penetran por la nariz y boca a la garganta, para procesarlos y desencadenar la respuesta inmune. Sus distintas estructuras son: amígdala faríngea, amígdala tubárica, amígdala palatina y la amígdala lingual.

BCL-6: Lo presentan células B del centro germinal. Es un factor de transcripción de células B.

Bulky: masa abultada o "bulky", definida como aquella masa cuyo tamaño (diámetro mayor) es superior a 5,7 cm y más frecuentemente 10 cm, valorando el área ganglionar más prominente.

CD5: lo presentan las células T, CLL/SLL. Tiene como función la señalización de TCR.

CD10: lo presentan células B inmaduras y precursores de células T, ALL pre-B, granulocitos, epitelio del bazo. Tiene como función el desarrollo de linfocito B.

CD11c: monocitos y granulocitos, algunas células NK, T. Tiene como función la unión al receptor 3 del complemento, CD54 y fibrinógeno.

CD19: lo presentan células del linaje B y leucemia mieloide aguda (AML) con la t(8;21). Tiene como función el desarrollo de células B.

CD20: lo presentan células B. Tiene función activación celular.

CD22: lo presentan las células B. Tiene función activación celular.

CD23: lo presentan las células dendríticas foliculares, CLL/SLL, subgrupo de células T y monocitos. Tiene función de transducción de señal mediante receptor de IgE.

CD30: lo presentan células B y T activadas, células de Reed-Sternberg y células Hodgkin, y linfoma anaplásico de células grandes (ALCL). Tiene función de activación celular.

CD38: lo presentan células NK, B, T y células plasmáticas. Función de síntesis de ADP-ribosa cíclica e hidrólisis.

CD43: lo presentan células T, células B activadas, células plasmáticas, células mieloides. Tiene como función la adhesión y inducción de apoptosis.

CD79a: lo presentan células B maduras y células pre-B. Tiene función de transducción de señal.

CD103: lo presentan linfocitos intraepiteliales, el timo y el bazo. Media la migración hacia el epitelio.

Células dendríticas: son células del sistema inmunitario que forman parte de la respuesta innata. Son capaces de fagocitar patógenos pero su función principal es procesar material antigénico y devolverlo a su superficie presentándolo a células especializadas del sistema inmunitario adaptativo. Son por tanto, células presentadoras de antígeno. Se localizan en las regiones superficiales del cuerpo como en la piel, faringe, cuello uterino, ano y mucosas del aparato respiratorio y digestivo.

Células histiocíticas: es un tipo de macrófago perteneciente al tejido conjuntivo que se presenta en diversos órganos (ganglio, bazo, hígado, placenta, cerebro y tejido mamario).

Células mesenquimales: forman parte del tejido conjuntivo laxo, de consistencia viscosa, rica en colágeno y fibroblastos. Hace referencia a los tejidos de sostén o de relleno que conforman los órganos.

Centrocito: célula B de pequeño tamaño que se encuentra en los folículos de los ganglios linfáticos.

Centro germinal: se forman en el centro de los folículos de los órganos linfoides secundarios (como los ganglios) cuando los linfocitos B entran en contacto con un antígeno. Ahí, los linfocitos B madurarán y se producirán cambios en el isotipo y se seleccionarán según su afinidad.

Ciclinas: familia de proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular.

Ciclos de rotura-fusión-puente: también conocido como Breakage-fusion-bridge (BFB) es una de las causas principales de la inestabilidad genómica. Los ciclos BFB se inician cuando la maquinaria de reparación falla en el momento de reparar roturas de la cadena de DNA y/o ante la presencia de telómeros acortados. Cuando esto ocurre, se producen fusiones cromosómicas incorrectas que favorecen la aparición de unas estructuras llamadas puentes anafásicos en la división celular, que pueden romperse y generar otras roturas, creando el ciclo de fusión-puente-rotura.

Clonal (clon): célula genéticamente idéntica que otra.

Cluster: conjunto de genes que codifican para la misma proteína. También usado para designar agrupación de muestras que comparten características moleculares, biológicas, patológicas y/o clínicas.

Cromotripsis: es la ruptura del DNA de las células en cientos de pequeños trozos en un momento puntual y que cuando la célula lo intenta reparar, lo hace incorrectamente generando mutaciones génicas que pueden iniciar un cáncer.

ECOG: el Eastern Cooperative Oncology Group es una herramienta que sirve para medir y objetivar la calidad de vida de un paciente oncológico. Mide la evolución de las capacidades del paciente en su vida diaria manteniendo al máximo su autonomía. La valoración va del 0-4, en el que cero indica paciente asintomático, capaz de realizar trabajo y actividades de la vida diaria; y cuatro indica paciente encamado al 100%.

Enhancer: es una región corta del DNA que puede unirse a factores de transcripción para aumentar los niveles de transcripción de los genes.

Hipergammaglobulemia: es el aumento de la tasa de gammaglobulinas del suero sanguíneo. Término empleado como sinónimo de hiperglobulinemia.

Hiperploidía: cualquier aumento del número normal diploide de cromosomas.

Homeobox: es una secuencia de DNA que forma parte de genes implicados en regulación del desarrollo de los animales. Estos genes codifican proteínas que actúan como factor de

transcripción de otros genes que indican a las células de distintos segmentos del embrión en desarrollo el tipo de estructuras que tienen que hacer.

IGH: es la abreviatura del gen que codifica para la cadena pesada de las inmunoglobulinas. En condiciones normales, este gen está sometido a mutaciones, deleciones o duplicaciones en el DNA, necesarias para proporcionar afinidad por el antígeno. Y en neoplasias linfoides, este gen se encuentra frecuentemente involucrado en translocaciones cromosómicas.

Inmunoglobulinas (IG): también conocidas como anticuerpos, son glicoproteínas que se pueden encontrar tanto de forma soluble en los fluidos corporales como la sangre, o como receptores en las células B. Su estructura tiene forma de "Y" y consta de dos cadenas pesadas idénticas y dos ligeras idénticas. Son empleadas por el sistema inmunitario para identificar y neutralizar elementos extraños tales como bacterias, virus o parásitos.

Ki-67: es una proteína asociada a la transcripción del RNA. Está presente en las fases activas del ciclo celular: Interfase (G_1 , S, G_2) y Mitosis, pero se encuentra ausente en reposo (G_0), por lo que resulta un buen marcador de proliferación celular.

Linfoma de Hodgkin: es un linfoma maligno que fue identificado por el Dr. Thomas Hodgkin en 1832. Representa el 30% de todos los linfomas, y se origina preferencialmente en los nódulos linfáticos de la región cervical, y se manifiesta con más frecuencia en personas jóvenes. Los tejidos neoplásicos presentan unas células características multinucleadas o bilobuladas llamadas células de Reed-Sternberg.

Loci: plural de locus, hace referencia a una posición fija de un cromosoma, como la posición de un gen o un marcador genético.

Macroglobulemia de Waldenström: es el resultado de la afección por linfoma linfoplasmocítico, en el que la sobreproducción de anticuerpos IgM que conduce a la hiperviscosidad de la sangre.

MUM1/IRF4: lo presentan células B que no pasan por centro germinal tardío o de paso tardío. Regula la expresión de genes en respuesta a interferón.

Naive (linfocito): es el linfocito B maduro que está en circulación sanguínea. Si dicho linfocito no se encuentra con su antígeno específico muere por apoptosis (en menos de un mes). En cuanto entra en contacto con su antígeno específico, dejará de ser virgen para convertirse en un linfocito activado.

Placas de Peyer: son cúmulos de folículos linfoides que están en la porción terminal del íleon. Su función es reconocer y absorber antígenos y patógenos, y desencadenar respuestas inmunitarias con especificidad a antígeno en la mucosa.

Prolinfocito: es el tipo celular situado dentro de la secuencia de maduración entre el linfoblasto y el linfocito.

Promotor: es la región del DNA que controla la iniciación de la transcripción a RNA. El promotor se encuentra en una de las dos hebras del DNA y la orientación y posición del promotor dictará cuál de las dos hélices del ADN servirá como molde para sintetizar el RNA.

Pulpa blanca: es una región del parénquima del bazo constituida por linfocitos y aparece diseminada. Macroscópicamente forma acúmulos blanquecinos.

Pulpa roja: es la región del parénquima del bazo formada por principalmente por eritrocitos, confiriendo una tonalidad rojiza en su aspecto macroscópico.

Receptor de célula T (TCR): es el receptor de linfocitos T, el cual se encuentra siempre anclado a la membrana celular. Reconocen péptidos de antígenos expuestos por las células presentadoras de antígeno y junto con otras moléculas de membrana como CD3, o el CMH (complejo mayor de histocompatibilidad) desencadenan una cascada de reacciones en el citoplasma iniciándose la activación de estas células.

Segmentos V(D)J: las inmunoglobulinas de los linfocitos B (con VDJ), y el receptor TCR de los linfocitos T (con VJ), están formados por estos segmentos (V: variable, D: diversidad, J: joining (unión)) de nucleótidos recombinados para combatir una variedad casi infinita de antígenos.

Splicing: el splicing de RNA es un proceso post-transcripcional de maduración del RNA del cual eliminan ciertos fragmentos secuenciales. Normalmente consiste en eliminar los intrones del transcrito primario y posteriormente unir los exones, aunque existen otros tipos donde se eliminan exones y/o retienen intrones.

ZAP70: lo presentan células T y CLL/SLL no mutadas. Es una tirosina quinasa involucrada en señalización de células T.

