



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

**Caracterització genètica del Limfoma de Cèl.lules
del Mantell i la Leucèmia Limfàtica Crònica mitjançant
microarrays i tècniques de seqüenciació:
noves eines pel diagnòstic i pronòstic**

David Martín García

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 (deposit.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 (deposit.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 (deposit.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.

INSTITUT D'INVESTIGACIONS BIOMÈDIQUES AGUSTÍ PI I SUNYER
FACULTAT DE MEDICINA I CIÈNCIES DE LA SALUT, UNIVERSITAT
DE BARCELONA
FUNDACIÓ CLÍNIC PER A LA RECERCA BIOMÈDICA

Caracterització genètica del Limfoma de Cèl.lules del Mantell i la Leucèmia Linfàtica Crònica mitjançant microarrays i tècniques de seqüenciació: noves eines pel diagnòstic i pronòstic.



Tesi presentada per **David Martín Garcia**
per optar al grau de Doctor
Programa de doctorat de Medicina i Recerca Translacional

FACULTAT DE MEDICINA I CIÈNCIES DE LA SALUT, UNIVERSITAT
DE BARCELONA

Directora: **Dra. Sílvia Beà Bobet**
Tutor: **Prof. Elías Campo Güerri**
Barcelona, 2018

Tesi presentada per:

David Martín García

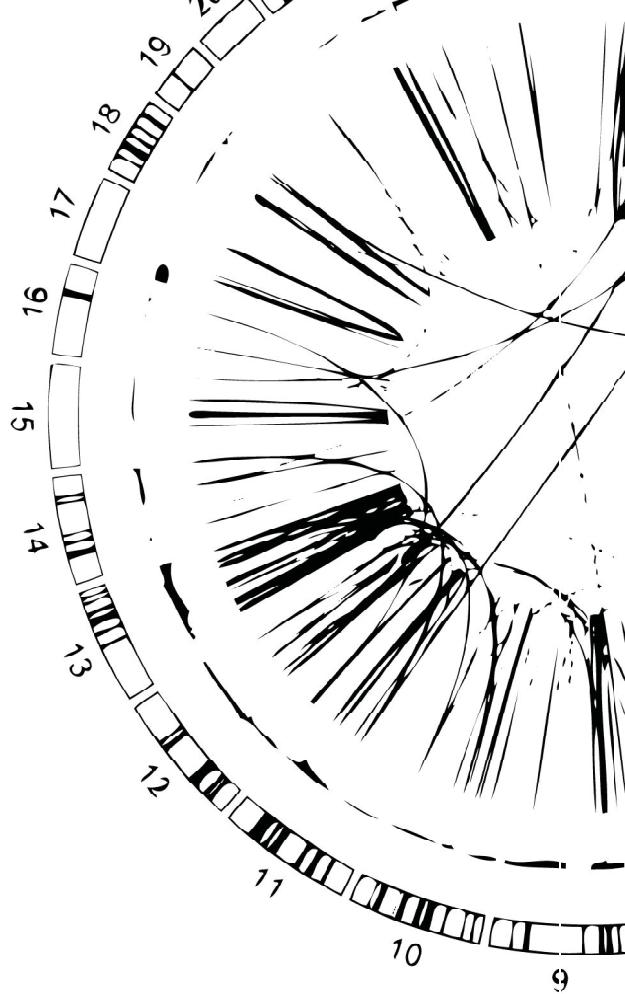
Directora: Dra. Sílvia Beà Bobet

Tutor: Prof. Elías Campo Güerri

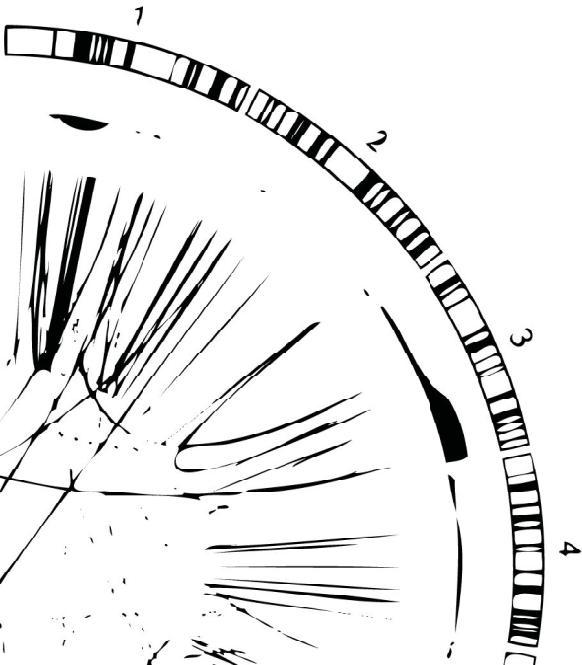
Tesi doctoral realitzada al Centre Esther Koplowitz (CEK), Barcelona.

“Res hauria succeït si algú no ho hagués imaginat”

Reinhold Messner



RESUM



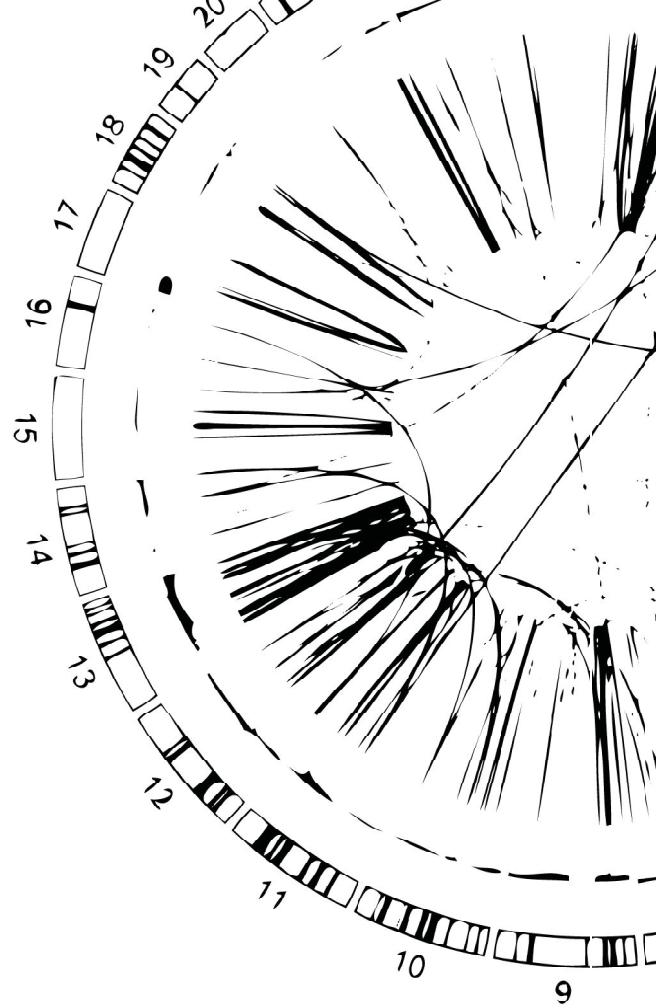
La hibridació *in situ* fluorescent, o FISH, és una tècnica molecular que s'utilitza en la rutina clínica pel diagnòstic i l'estratificació de diferents neoplàsies. En els estudis d'aquesta tesi s'ha observat que en neoplàsies limfoides de cèl·lula B, la tècnica de FISH té algunes limitacions i que són necessàries millores per fer un diagnòstic i una estratificació pronòstica més acurats.

En l'**estudi 1** proposem una nova plataforma de microarray per estratificar la Leucèmia limfàtica crònica (CLL) sense la necessitat d'utilitzar la tècnica de FISH. La CLL és una malaltia molt comú amb un curs clínic molt variable. S'ha descrit que diferents alteracions genètiques i la complexitat genòmica estan relacionades amb un pitjor pronòstic. L'objectiu de l'**estudi 1** va ser dissenyar una plataforma de microarray, anomenada qChipHemo, que analitzés no només les quatre alteracions recurrents en la CLL, que s'analitzen amb la tècnica de FISH, sinó també altres regions recurrents, la complexitat genòmica i la cromotripsi. Utilitzant qChipHemo vam poder estratificar, en un sol experiment i amb elevada sensibilitat, els casos analitzant totes les alteracions amb significat pronòstic, com 11q, 13q, 17p, la complexitat genòmica o la cromotripsi. Per tant, podem conoure que l'ús de qChipHemo permet una millor estratificació pronòstica en la CLL comparat amb la tècnica de FISH i proposem que seria una bona opció per ser utilitzada en la rutina clínica.

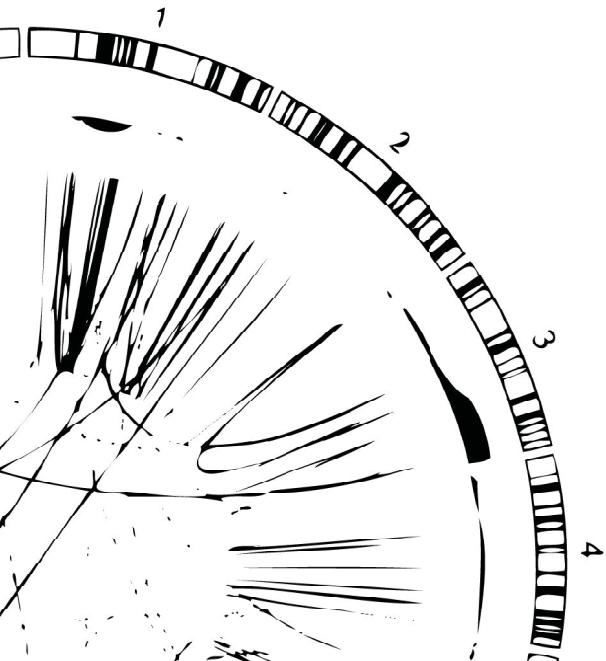
En l'**estudi 2** vam poder identificar l'alteració oncogènica primària en la majoria de casos amb Limfoma de cèl·lules del mantell Ciclina D1-negatiu (MCL), un subgrup de MCL que no presenta la translocació oncogènica primària t(11;14)(q13;q32) ni la sobreexpressió de ciclina D1. Mitjançant la tècnica de FISH vam poder detectar que el 70% dels casos MCL Ciclina D1-negatius presentaven una translocació a CCND2 provocant la seva sobreexpressió. La resta dels casos sobreexpressaven CCND2, CCND3 o CCNE1 i CCNE2 concomitant sense reordenament apparent utilitzant la tècnica de FISH *break-apart*. Mitjançant tècniques de seqüenciació de nova generació (NGS) vam poder detectar una inserció críptica de l'*enhancer* de la immunoglobulina IGK o IGL que explicava la sobreexpressió de la ciclina D3 en 3 casos. A partir de la localització de la inserció obtinguda per NGS, vam poder dissenyar unes sondes específiques per poder detectar el reordenament críptic utilitzant FISH amb sondes de fusió i vam observar que en un 16% dels casos presentaven una inserció críptica de l'*enhancer* de les immunoglobulines proper a CCND3 i 7% dels casos proper a CCND2. Per tant, utilitzant una combinació de tècniques moleculars i FISH amb sondes específiques hem pogut detectar el reordenament primari oncogènic en el 93% dels casos MCL Ciclina D1-negatius. La detecció d'aquests

reordenaments permet, doncs, diagnosticar d'una manera més acurada els casos MCL Ciclina D1-negatius.

Per concloure, creiem que l'ús de FISH en la rutina clínica per al pronòstic i diagnòstic en neoplàsies limfoides de cèl·lula B té unes limitacions. No obstant, l'ús de noves tecnologies i la combinació del FISH amb tècniques moleculars permeten que el pronòstic i el diagnòstic en la CLL i el MCL sigui més acurat.

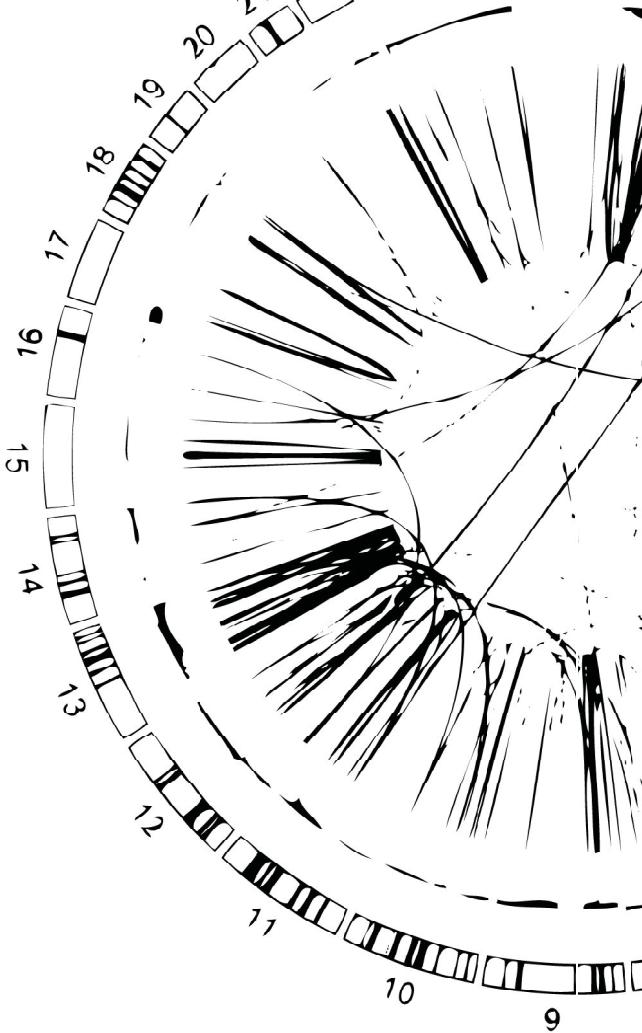


ÍNDEX

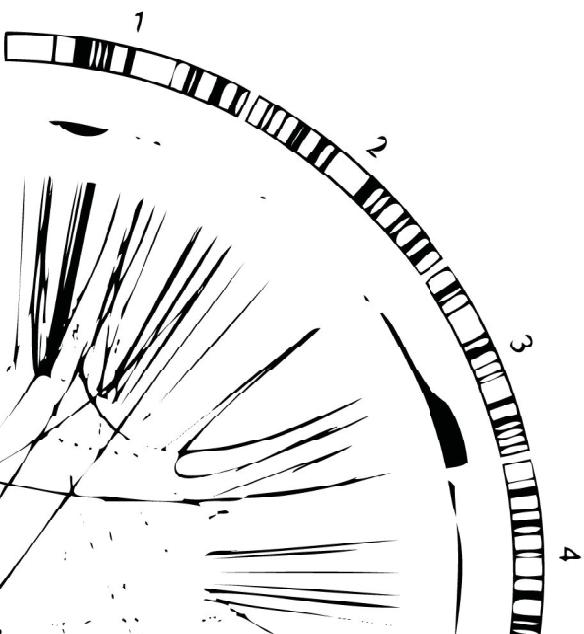


Índex

ABREVIACIONS	11
INTRODUCCIÓ	15
1. Genòmica del càncer	17
2. Alteracions puntuals	18
3. Alteracions genòmiques estructurals	19
3.1 Tipus de variants estructurals	20
3.1.1. Alteracions en el número de còpies, pèrdua d'heterozigositat (LOH) i pèrdua d'heterozigositat neutra en el número de còpies (CNN-LOH)	20
3.1.2. Translocacions, duplicacions, delecions, inversions i insercions	22
3.1.3. Cromotripsi	26
3.1.4. Cromoplèxia	31
4. Mètodes de detecció d'alteracions genètiques	32
4.1. Cariotip i FISH	34
4.2. <i>Microarrays</i> de còpia gènica	35
4.3. Seqüènciació completa de l'exoma	36
4.4. Seqüènciació completa del genoma	37
4.5. Seqüènciació completa Mate-Pair del genoma	38
5. Limfomes no-Hodgkin de cèl·lula B.....	39
5.1 Diferenciació de cèl·lula B i limfomagènesi	40
6. Leucèmia Limfàtica Crònica (CLL).....	43
6.1. Característiques clínico-biològiques.....	43
6.2. Alteracions genètiques rellevants de la CLL	44
6.3. Relació entre el pronòstic i les alteracions genètiques.....	52
7. Limfoma de Cèl·lules del Mantell (MCL)	56
7.1. Característiques clínico-biològiques.....	56
7.1.1. Immunoglobulines en el MCL	57
7.1.2. Rol oncogènic de SOX11 en el MCL.....	57
7.2. Esdeveniment oncogènic inicial: desregulació de la ciclina D1	58
7.3. Formes indolents.....	60
7.4. MCL Ciclina D1-negatiu.....	62
7.5. Esdeveniments secundaris relacionats amb la patogènesis del MCL.....	64
7.6. Relació entre el pronòstic i les alteracions genètiques.....	69
HIPÒTESIS I OBJECTIUS	73
RESULTATS	77
Estudi 1	79
Estudi 2	113
DISCUSSIÓ.....	163
CONCLUSIONS	183
BIBLIOGRAFIA	187

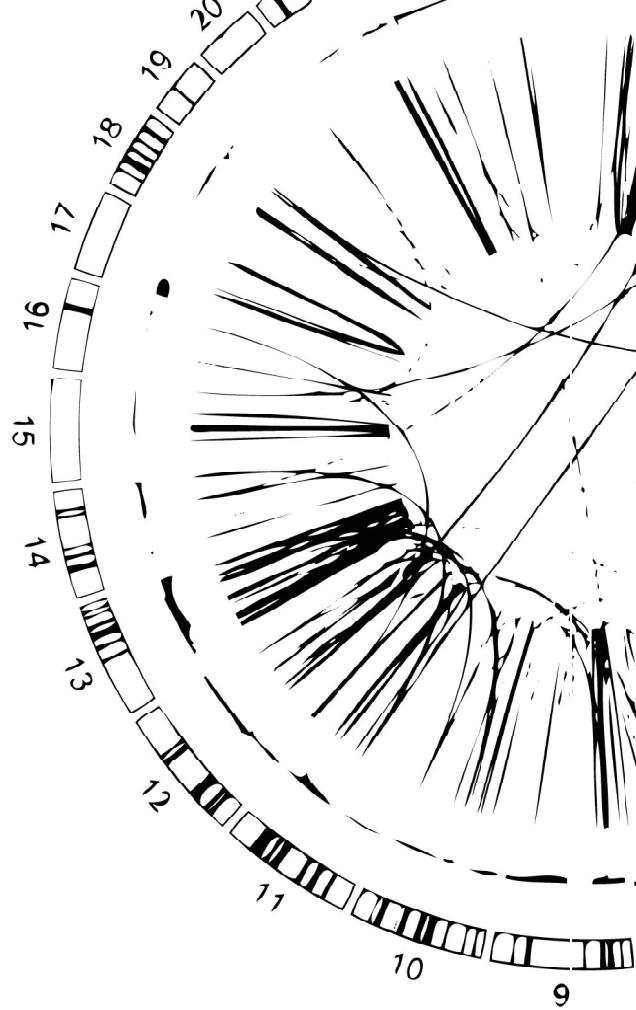


ABREVIACIONES

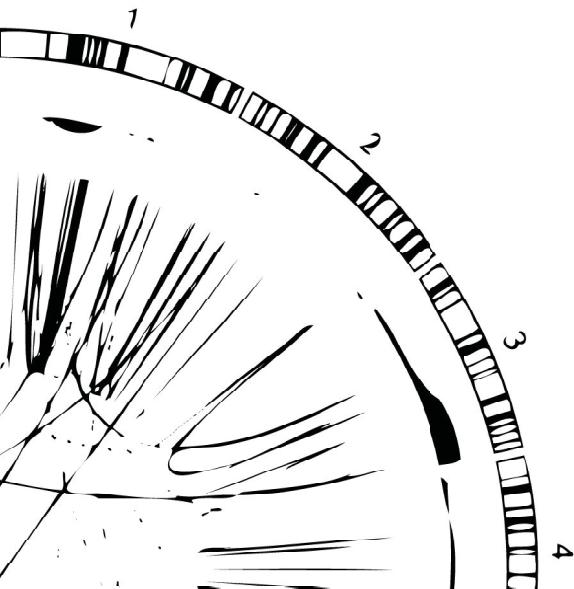


ADN	Àcid desoxiribonucleic
A-EJ	Unió d'extrems alternatius (de l'anglès <i>Alternative End Joining</i>)
AID	Activació induïda de la desaminasa (de l'anglès <i>activation-induced deaminase</i>)
ARN	Àcid ribonucleic
BAF	Freqüència al·lèlica B (de l'anglès <i>B-allele Frequency</i>)
BCR	Receptors d'antigen de cèl·lula B (de l'anglès <i>B-cell Receptor</i>)
BFB	Cicles de trencament-fusió de ponts (de l'anglès <i>Breakage-fusion-bridge cycles</i>)
CG	Centre Germinal
CGH	Hibridació genòmica comparada (de l'anglès <i>Comparative Genomic Hybridization</i>)
CLL	Leucèmia limfàtica crònica (de l'anglès <i>Chronic Lymphocytic Leukemia</i>)
cMCL	Limfoma de cèl·lules del mantell convencional (de l'anglès <i>conventional Mantle Cell Lymphoma</i>)
CNA	Alteracions en el número de còpies (de l'anglès <i>Copy Number Alteration</i>)
CNN-LOH	Pèrdua d'heterozigositat neutra en el número de còpies (de l'anglès <i>Copy Number Neutral Loss of Heterozygosity</i>)
CSR	Recombinació de canvi de classe (de l'anglès <i>Class Switch Recombination</i>)
DLBCL	Limfoma B difús de cèl·lules grans (de l'anglès <i>Diffuse Large B-cell Lymphoma</i>)
FFPE	Parafina fixada amb formalina (de l'anglès <i>Formalin-Fixed Paraffin-Embedded</i>)
FISH	Hibridació <i>in situ</i> fluorescent (de l'anglès <i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>)
FL	Limfoma fol·licular (de l'anglès <i>Follicular Lymphoma</i>)
GEP	Perfil d'expressió gènic (de l'anglès <i>Gene Expression Profiling</i>)
HMG	Grup d'alta movilitat (de l'anglès <i>High Mobility Group</i>)
HR	Recombinació homòloga (de l'anglès <i>Homologous Recombination</i>)
INDEL	Inserció/Deleció
LOH	Pèrdua d'heterozigositat (de l'anglès <i>Loss of Heterozygosity</i>)
MCL	Limfoma de cèl·lules del mantell (de l'anglès <i>Mantle Cell Lymphoma</i>)
MP-WGS	Seqüenciació completa Mate-Pair del genoma (de l'anglès <i>Mate-Pair Whole Genome Sequencing</i>)
NGS	Seqüenciació de nova generació (de l'anglès <i>Next Generation Sequencing</i>)
NHEJ	Unió d'extrems no homòlegs (de l'anglès <i>Non-Homologous End Joining</i>)
nnMCL	MCL leucèmic no nodal (de l'anglès <i>Non Nodal Mantle Cell Lymphoma</i>)
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa (de l'anglès <i>Polymerase Chain Reaction</i>)

PE	Extrem parejat (de l'anglès <i>Paired End</i>)
qPCR	PCR quantitativa a temps real (de l'anglès <i>quantitative PCR</i>)
RS	Síndrome de Richter (de l'anglès <i>Richter Syndrome</i>)
SHM	Hipermutació somàtic (de l'anglès <i>Somatic Hypermutation</i>)
SLVL	Limfoma esplènic amb limfòcits vellosos (de l'anglès <i>Splenic Lymphoma with Villous Lymphocytes</i>)
SMZL	Limfoma esplènic de zona marginal (de l'anglès <i>Splenic Marginal Zone Lymphoma</i>)
SNP	Polimorfisme de nucleòtid simple (de l'anglès <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
SNV	Variació de nucleòtid simple (de l'anglès <i>Single Nucleotide Variant</i>)
TSS	Zona d'inici de la transcripció (de l'anglès <i>Transcription Start Site</i>)
WES	Seqüenciació completa de l'exoma (de l'anglès <i>Whole Exome Sequencing</i>)
WGS	Seqüenciació completa del genoma (de l'anglès <i>Whole Genome Sequencing</i>)
WHO	Organització Mundial de la Salut(de l'anglès <i>World Health Organization</i>)



INTRODUCCIÓ



1. Genòmica del càncer

El genoma humà està constituit per ADN (àcid desoxiribonucleic) de doble cadena, el material genètic que conté la informació necessària per generar totes les cèl·lules i tipus cel·lulars de l'organisme humà. El genoma que conté cada cèl·lula hauria de ser idèntic però no és així. Les cèl·lules poden acumular canvis en el material genètic. La majoria d'aquests canvis són mutacions provinents d'errors en la replicació o dany de l'ADN (factors externs, radiacions ionitzants,...) que es van acumulant en cada generació cel·lular. S'estima que s'acumulen entre 2 i 10 mutacions per divisió cel·lular en limfòcits B i T i una freqüència similar en cèl·lules de la retina i de l'epiteli intestinal (Campbell and Martincorena, 2015). Així doncs, la prediccio en una cèl·lula normal és que acumuli entre centenars i milers de mutacions, una quantitat molt semblant a alguns càncers. La majoria d'aquestes mutacions no tenen cap efecte rellevant, però, malauradament, en algunes ocasions algunes d'aquestes mutacions poden afectar gens o elements reguladors que alterin funcions cel·lulars de gran importància per al correcte funcionament cel·lular. Estudis de seqüenciació de cèl·lules normals de la sang en persones majors de 65 anys confirmen que al voltant d'un 10% de les alteracions adquirides són alteracions amb un factor de selecció positiva per aquella cèl·lula, un patró, que ja es veu en leucèmies. Aquest clon cel·lular continua funcionant com a cèl·lules de sang però té una probabilitat de convertir-se en un clon precancerós. La selecció positiva d'aquest clon pot conferir a aquestes cèl·lules un millor creixement, un increment de la proliferació o eludir la quiescència, senescència o mort cel·lular augmentant d'aquesta manera la supervivència del clon cel·lular. Quan parlem de clon precancerós ens referim a cèl·lules que s'han desenvolupat de forma anormal i que en un teixit veiem certs canvis histològics amb un increment del risc de transformar-se en cèl·lules canceroses.

Tot i que cada cèl·lula en el nostre organisme té la capacitat de poder-se propagar amb rapidesa, aquesta funció està inactiva. Malauradament amb el temps, les alteracions es van acumulant al genoma i juntament amb la selecció positiva de les alteracions, poden reactivar la propagació descontrolada de les cèl·lules. L'acumulació d'alteracions durant el temps es troba relacionada amb la probabilitat de patir un càncer amb l'edat: la probabilitat de patir un càncer abans dels 40 anys és d'un 2% aproximadament, però incrementa fins al 50% a l'edat dels 80.

El càncer es produeix degut a l'acumulació d'alteracions a l'ADN en cèl·lules somàtiques activant diferents oncogens o inactivant gens supressors de tumors, augmentant

la proliferació cel·lular, alterant el cicle cel·lular, l'apoptosis o la reparació de l'ADN entre d'altres, conferint a aquestes cèl·lules un millor creixement i iniciant d'aquesta manera un procés tumorigènic (Stratton *et al.*, 2009). Cal destacar que per desenvolupar un tumor i provocar una progressió cel·lular, un sol esdeveniment genètic no és suficient, sinó que cal una acumulació d'esdeveniments genètics.

2. Alteracions puntuals

El material genètic està conformat per unions de 4 nucleòtids diferents: Adenina, Guanina, Citosina i Timina, i es poden classificar segons la composició atòmica en purines (Adenina i Guanina) o pirimidines (Citosina i Timina). Segons la combinació d'aquests 4 nucleòtids, el material genètic presenta diferents zones d'informació: zones sense cap informació gènica o zones on la combinació dels diferents nucleòtids ha permès la formació de diferents gens. El gen és considerat una unitat d'emmagatzematge d'informació que permet la transmissió d'informació a l'herència i que és essencial per a les funcions de la cèl·lula. Els gens es troben constituïts per regions codificant anomenades exons o per regions no codificant que s'anomenen introns i que a l'hora de la transcripció, aquests són eliminats en la maduració de l'ARN (*splicing*). Davant dels gens també es troben les zones del promotor, regions que permeten la transcripció del gen i finalment regions amplificadoras o *enhancers* que provoquen un augment en la transcripció d'aquest gen. Els *enhancers* es poden trobar lluny del gen que regularan.

Parlem d'alteració puntual o mutació (SNV) al fenòmen pel qual el material genètic s'altera en uns nucleòtids concrets. Hi ha diferents classes de mutacions: substitucions de bases i canvi en el nombre total de bases. La substitució de bases es pot donar en regions no codificant. Aquestes substitucions poden afectar regions promotores, *enhancers* o *splicing* per exemple. Les substitucions de bases també poden afectar regions codificant provocant canvis aminoacídics (mutacions no sinònimes) o sense provocar cap canvi (mutacions sinònimes). D'altra banda, les alteracions puntuals també poden ser canvis en el nombre total de bases inserint o delecionant material genètic en una regió concreta. Aquestes insercions o deleccions poden ser d'una o més bases i provoquen un canvi de pauta de lectura quan són diferents de 3 (**Figura 1**).

Les mutacions també es poden classificar en mutacions *driver*, alteracions que provoquen una selecció positiva a la cèl·lula, i mutacions *passenger*, alteracions que no tenen cap efecte biològic o fenotípic a la cèl·lula. L'acumulació de mutacions *driver* en un

clon cel·lular pot provocar que la cèl·lula escapi del seu programa normal cel·lular somàtic adquirint una proliferació més elevada i donant com a resultat l'aparició d'un càncer (Campbell and Martincorena, 2015). S'ha observat que la mitjana de mutacions driver que presenta un càncer és de 4,6 mutacions driver per cas (Sabarinathan *et al.*, 2017). Tot i això i encara que calcular el nombre total de mutacions d'un cas és relativament senzill, classificar aquestes mutacions en *drivers* o *passengers* continua sent un repte, sobretot en tumors on s'adquireixen gran nombre de mutacions o adquereixen alteracions genòmiques estructurals.

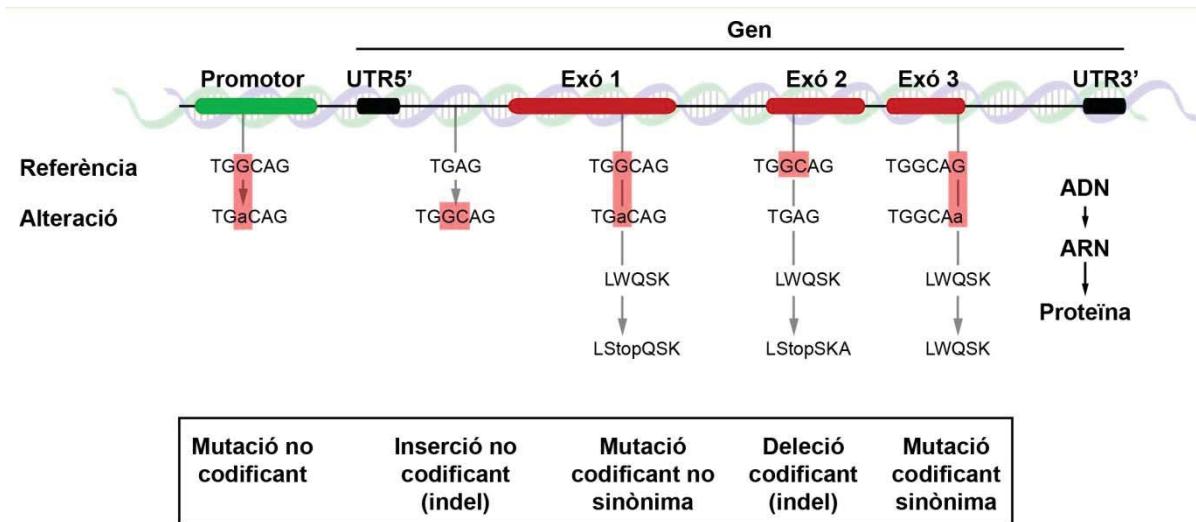


Figura 1. Representació d'alteracions (SNV i indels) en el gen.

3. Alteracions genòmiques estructurals

Quan parlem d'alteracions genòmiques que afecten segments d'ADN grans parlem de variants estructurals. Les variants estructurals poden ser observades microscòpicament o submicroscòpicament i algunes d'elles poden estar associades a fenotips característics o malalties concretes (Feuk, Carson and Scherer, 2006). Anys enrere només alteracions estructurals que canviaven la quantitat i l'estructura dels cromosomes com aneuploidies, reordenaments, heteromorfismes i llocs fràgils podien ser observades, donat que al ser més grans de 3 Mb es podien observar al microscopi com a canvis en els cromosomes. Amb l'avanç de noves tecnologies de seqüenciació, translocacions i alteracions estructurals més petites d'1kb, com poden ser insercions, deleccions o inversions s'han pogut observar. Quan trobem alteracions estructurals amb un tamany entre 1kb i 3 Mb parlem d'alteracions estructurals submicroscòpiques.

Les alteracions estructurals són tant o més importants que les alteracions puntuals donat que alteren milions de bases d'ADN, podent afectar gens sencers i regions reguladores de gens, i causant per si soles malalties genètiques. Un dels exemples més clars és la duplicació de tot el cromosoma 21, causant el síndrome de Down o la translocació que afecta el cromosoma 8 i 14 que desregula el gen *MYC* causant malalties com el Limfoma de Burkitt o la Leucèmia limfoblàstica aguda (Haluska *et al.*, 1986).

3.1 Tipus de variants estructurals

Les primeres evidències de variants estructurals microscòpiques van ser l'observació de cromosomes individuals. En cèl·lules sanes humanes es poden observar 46 cromosomes, dels quals hi ha 22 autosòmics (2 còpies de cadascun) i 2 cromosomes sexuals (XX o XY). En cèl·lules alterades, però, es poden detectar aneuploidies, grans reordenaments, variants de satèl·lits en cromosomes acrocèntrics, llocs fràgils o canvis de tamany en regions heterocromàtiques. Amb l'avenç de les noves tecnologies d'anàlisi cromosòmic com ara la Hibridació *in situ* fluorescent (FISH) i utilitzant sondes de regions específiques, l'anàlisi es va refinar detectant moltes més variacions heteromòrfiques, translocacions recíproques, delecions, duplicacions, insercions i inversions de gran tamany.

La millora en el desenvolupament experimental i noves estratègies computacionals en els anys posteriors ha permès analitzar les variants genètiques estructurals submicroscòpiques, a una resolució de parells de bases.

3.1.1. Alteracions en el número de còpies, pèrdua d'heterozigositat (LOH) i pèrdua d'heterozigositat neutra en el número de còpies (CNN-LOH)

El genoma humà està conformat per dos còpies de material genètic teòricament idèntic, cada una de les còpies provinents de cada part parental ($2n$). Així doncs, l'ésser humà conté dues còpies de cada regió del genoma. Les alteracions en el número de còpia són segments d'ADN on el número de còpies de l'ADN és diferent al del genoma de referència (diferent de 2). Les alteracions en el número de còpia es poden classificar com guanys o pèrdues.

El fenomen pel qual la dosi gènica augmenta s'anomena guany o amplificació dependent si augmenta en una còpia o augmenta en 2 o més còpies. Una mala segregació dels cromosomes durant la mitosi o una mala replicació de l'ADN poden ser la causa de guanys i amplificacions i aquests provocar una sobreexpressió dels gens localitzats en les

regions de guanys. En càncers les amplificació acostumen a localitzar-se en regions on es troben proto-oncogens provocant un augment de la proliferació. Ocasionalment una gran quantitat de còpies d'un segment també pot generar pseudocromosomes dobles diminuts separats de la resta dels cromosomes.

Ara bé, quan la dosi gènica es perd en un segment cromosòmic o un cromosoma sencer, aquest fenomen s'anomena deleció, si una de les dos còpies s'ha perdut, o deleció homozigota si les dues còpies del genoma s'han eliminat. Punts fràgils de trencament en el segments cromosòmics o una mala reparació de l'ADN poden ser algunes de les causes d'una deleció. En càncer les deleccions amb un efecte a la malaltia acostumen a localitzar-se en regions amb gens supressors de tumors.

Les deleccions provoquen una pèrdua d'una regió d'una de les còpies paternes del genoma. Aquesta pèrdua d'una còpia paterna genera una pèrdua d'heterozigositat (LOH). La LOH però també pot ser causada per una pèrdua d'heterozigositat neutra en el número de còpies (CNN-LOH) en el qual un segment d'un cromosoma es perd i la còpia restant es duplique. La CNN-LOH es dóna per una no-disjunció mitòtica o una recombinació mitòtica. Les CNN-LOHs també poden provocar una inactivació dels gens supressors de tumors, donat que no hi ha cap còpia normal del segment i la duplicació del segment únic provoca la duplicació del gen alterat. Les CNN-LOHs no es poden detectar per FISH ja que el número de còpies continuen sent dos, encara que provinguin d'un sol progenitor, tan sols es poden detectar per tècniques d'SNParrays o per PCR de genotipat d'SNPs (**Figura 2**).

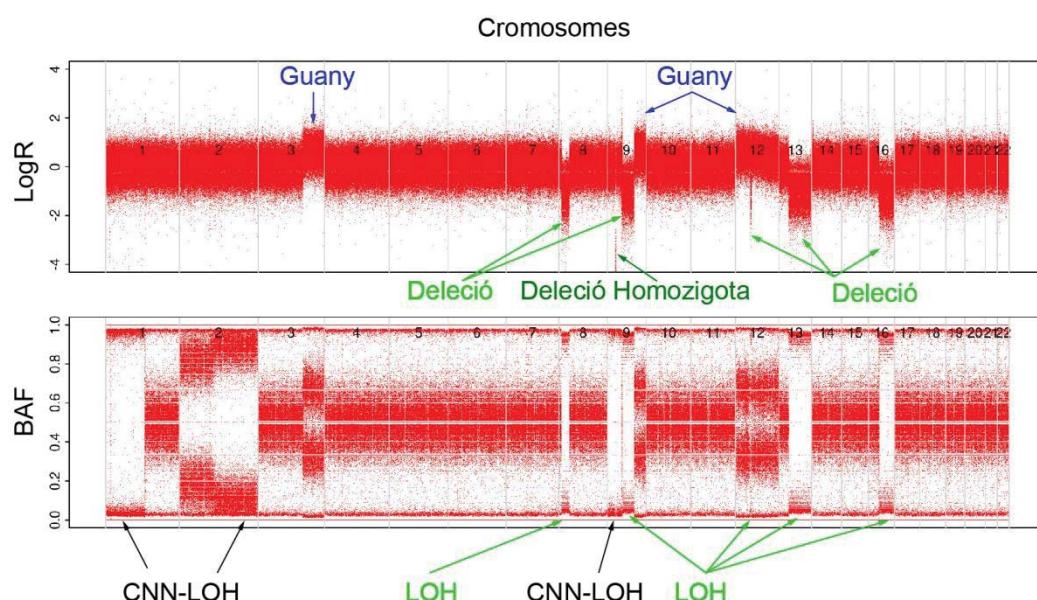


Figura 2. Representació de CNA, LOH i CNN-LOH. BAF: Freqüència al·lèlica de l'al·lel B.

3.1.2. Translocacions, duplicacions, delecions, inversions i insercions

Anomenem translocació a la variant estructural que es dóna quan hi ha un canvi de posició d'un segment d'un cromosoma, normalment cap a un altre cromosoma. Les translocacions són degudes a dos punts de trencament en dos cromosomes diferents i la mala reparació de l'ADN. Segons on es localitzin aquestes variants estructurals poden produir desregulacions de proteïnes o proteïnes de fusió, si els punts de trencament es localitzen prop o dins de gens. Es poden diferenciar translocacions equilibrades o desequilibrades segons si la variant estructural provoca una pèrdua o guany del material (desequilibrat) o no. Les translocacions són molt comuns en cèl·lules canceroses i cal destacar que les translocacions equilibrades acostumen a ser més tolerables que les desequilibrades donat que no hi ha cap pèrdua de material genètic. Les cèl·lules tumorals adquereixen una gran quantitat de translocacions ja siguin en un mateix cromosoma, intracromosòmiques, o entre dos cromosomes, intercromosòmiques (**Figura 3**).

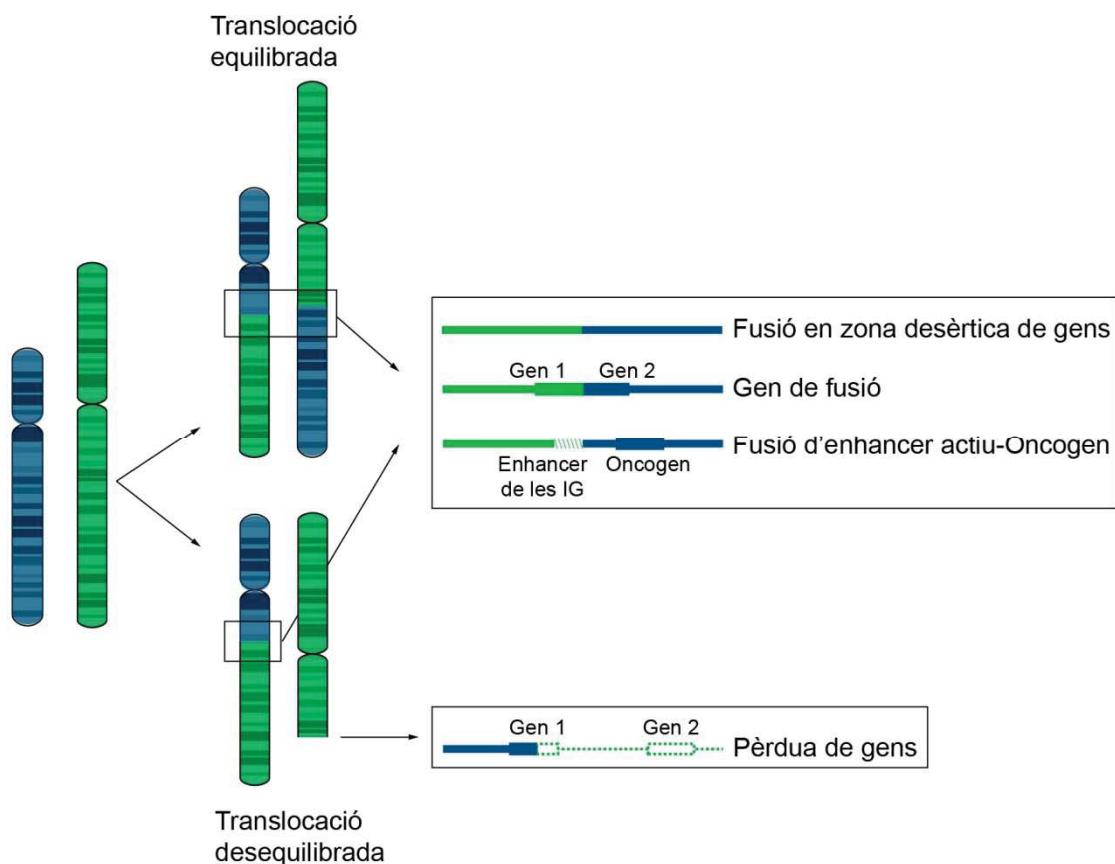


Figura 3. Representació de les translocacions i les seves causes funcionals.

A part de les translocacions, també hi ha altres reordenaments que poden afectar a la integritat del genoma. Les duplicacions són repeticions d'un segment del cromosoma o d'un cromosoma sencer que es poden trobar adjacents l'un amb l'altre o en una altra regió

del cromosoma. Les delecions són alteracions estructurals que provoquen una pèrdua d'un segment del cromosoma o d'un cromosoma sencer i que requereixen de dos punts de trencament o un punt de trencament i un extrem del cromosoma perquè succeeixi. Donat que aquestes regions trencades no contenen centròmer, si no s'uneixen a un altre fragment aquestes regions no es separen en cap pol del fus mitòtic en la divisió cel·lular i s'acaba perdent. Les inversions són reordenaments que també requereixen dos punts de trencament en el mateix cromosoma però, en aquest cas, el segment trencat gira 180 graus i es reordena en el mateix cromosoma. L'inserció, d'altra banda, es dóna quan un segment trencat s'uneix en una altre punt de trencament ja sigui en el mateix cromosoma o en un altre cromosoma diferent. Perquè es produueixi una inserció, doncs, es requereix com a mínim dos punts de trencament pel segment que es separa i per un o dos punts de trencament on s'unirà aquest segment (**Figura 4**).

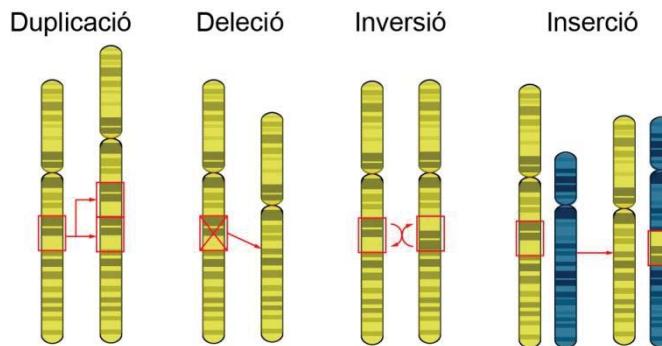


Figura 4. Representació d'altres alteracions estructurals: duplicació, deleció, inversió i inserció de material genètic.

Els mecanismes de reparació dels punts de trencament en les alteracions estructurals poden ser molt diversos, tot i que les més destacables són la unió d'extrems no homòlegs (NHEJ), la unió d'extrems alternatiu (A-EJ) o la recombinació homòloga (HR) (Ceccaldi, Rondinelli and D'Andrea, 2016) (**Figura 5**). En cèl·lules limfoides les funcions fisiològiques del complexe RAG, un complexe que talla i doblega la seqüència V(D)J en la recombinació de les immunoglobulines, o del complexe AID en la recombinació de locus de les cadenes pesades de la immunoglobulina també contribueixen a la formació de translocacions.

Unió d'extrems no homòlegs (NHEJ)

Les translocacions, i en especial aquelles que fusionen dos gens, es donen degut a la unió de dos punts de trencament de doble cadena d'ADN, en dos cromosomes no homòlegs. Aquest trencament de doble cadena s'uneix amb l'altre trencament gràcies al

complex NHEJ, un complex de reparació de l'ADN endògen de la cèl·lula. El complex més estudiat en mamífers és la NHEJ clàssica, on heterodímers dels gens Ku70 i Ku80 juntament amb PRKDC, Artemis, els gens XRCC4 i LIG4 s'uneixen als extrems dels punts de trencament de l'ADN i uneixen els dos segments d'ADN. Estudis anteriors també han observat que el complex NHEJ provoca translocacions entre cromosomes que tenen telòmers escurçats. A més a més, també es va observar que el NHEJ és un mecanisme que a part de contribuir a la formació de translocacions també es troba involucrat en esdeveniments cromotríptics (Bunting and Nussenzweig, 2013). Per tant, quan altres complexes de reparació de l'ADN són disfuncionals, el complex NHEJ pot generar la formació de translocacions, incrementant la inestabilitat genòmica i contribuint a l'adquisició d'un càncer.

Unió d'extrems alternatiu (A-EJ)

Quan el complex NHEJ no és funcional, la unió de punts de trencament es dóna per altres mecanismes. El més significant és la A-EJ, un mecanisme que uneix els punts de trencament per microhomologia, provocant, no obstant, petites deleccions als voltants dels punts de trencament. En cèl·lules on els gens necessaris per una NHEJ, com poden ser Ku70, Ku80 o XRCC4, l'A-EJ pot generar translocacions i reorganitzacions estructurals més complexes. El complex A-EJ està format pel gen CtIP, una exonucleasa que provoca l'excisió de pocs nucleòtids als extrems per formar microhomologia entre els dos segments. Posteriorment, els gens LIG1 o LIG3 relliguen els dos segments per produir una nova unió. Tot i que se sap que l'A-EJ pot produir translocacions, la NHEJ clàssica és el mecanisme més comú en reordenaments.

Recombinació homòloga (HR)

Un altre mecanisme per reparar punts de trencament a l'ADN de doble cadena és la recombinació homòloga. Aquest mecanisme necessita d'homologia entre els dos punts de trencament. Per a la recombinació de regions homòlogues en els punts de trencament, el gen MRE11 juntament amb RAD50 i NBS1 s'uneix als extrems de l'ADN. CtIP també s'uneix començant l'excisió de la cadena de l'ADN. EXO1 també s'ha trobat implicat en la generació de cadenes d'ADN simples per generar HR. La HR és menys propensa a patir errors que la NHEJ quan està reparant el trencament de doble cadena. No obstant, aquests dos mecanismes competeixen entre ells i per evitar que el mecanisme de NHEJ actui, les Ciclines Depenents de Kinases (CDK) regulen l'activitat d'excisió de nucleòtids afavorint l'activació de la HR a l'hora de reparar trencaments de doble cadena, sobretot en les fases S i G2 del cicle cel·lular.

La regulació dels mecanismes de reparació de trencament de doble cadena és extremadament complexa activant un mecanisme de reparació diferent de l'altre dependent de molts factors. 53BP1, per exemple, pot reprimir l'activació de la recombinació homòloga bloquejant l'excisió de nucleòtids. 53BP1 afavorirà doncs una reparació molt més ràpida a partir de la NHEJ amb un potencial cost d'adquisició de mutacions. Les proteïnes DNA-PKcs també afavoreixen la regulació de la NHEJ, reprimint l'activació de la recombinació homòloga. D'altra banda BRCA1 juntament amb CtIP evitaria l'acumulació de 53BP1 als punts de trencament afavorint d'aquesta manera la recombinació homòloga.

Altres mecanismes que afavoreixen a les translocacions

S'ha observat que algunes translocacions que es troben en diferents malalties limfoides es donen entre regions constants de les immunoglobulines i altres gens. Aquestes translocacions són tan comuns degut als trencaments de doble cadena que es donen a causa de l'activació induïda per la citidina deaminasa (AID). Un altre mecanisme que pot afavorir a la formació d'una translocació són els punts fràgils. Tot i que tot el genoma es replica a cada cicle cel·lular i, per tant, tot el material és potencial de poder patir un trencament de doble cadena, hi ha regions que són més vulnerables a patir un trencament quan hi ha estrès replicatiu.

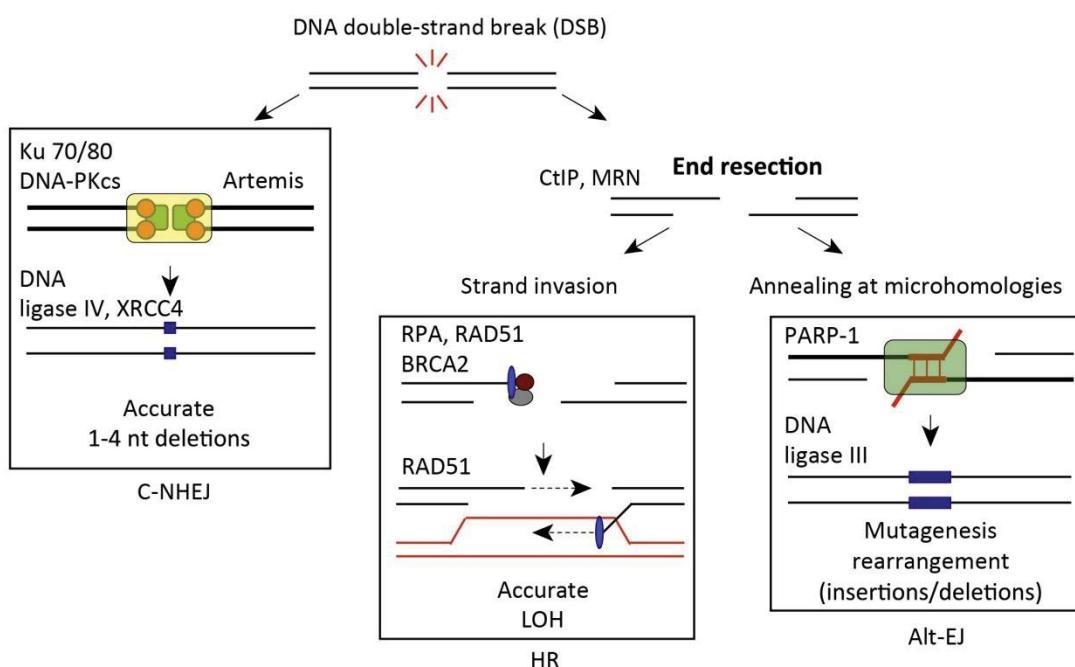


Figura 5. Representació dels mecanismes de reparació en els punts de trencament de les alteracions estructurals: Unió d'extrems no homòlegs per via convencional (C-NHEJ), Recombinació homòloga (HR) i Unió d'extrems alternatiu (A-EJ). Figura adaptada de l'article Ceccaldi et al. 2016

3.1.3. Cromotripsi

Les cèl·lules somàtiques per esdevenir tumorigèniques necessiten d'una acumulació d'alteracions al llarg del temps. En el 2011, però, es publicava una procés alternatiu per al desenvolupament del càncer on una reorganització estructural massiva d'un cromosoma es donava en un sol esdeveniment (Stephens *et al.*, 2011). El procés pel qual un cromosoma es segmenta en molts fragments i es repara en un sol esdeveniment catastròfic s'anomena cromotripsi, del grec *chromo* que significa color i que representa els cromosomes i *thripsis* que significa trencament en fragments (**Figura 6**). Les principals característiques d'una cromotripsi són entre 10 i 100 reorganitzacions de l'ADN en una zona molt focalitzada del cromosoma, amb una oscil·lació del número de còpies de l'ADN amb diferents segments perduts i tot aquest procés donant-se en un sol esdeveniment catastròfic. Ocasionalment també podem trobar que alguns segments no es reorganitzen dins del cromosoma; en comptes d'això es recircularitza sobre ell mateix donant unes molècules d'ADN circular anomenades cromosomes *double-minute*. Normalment aquestes petites molècules acostumen a ser regions amb gens oncogènics amplificats. La prevalença de la cromotripsi depèn molt del tipus de càncer, observant càncers com els d'ovari on no s'ha observat mai aquest esdeveniment o altres càncers com el medulblastoma amb una prevalença del 13% (Rode *et al.*, 2016).

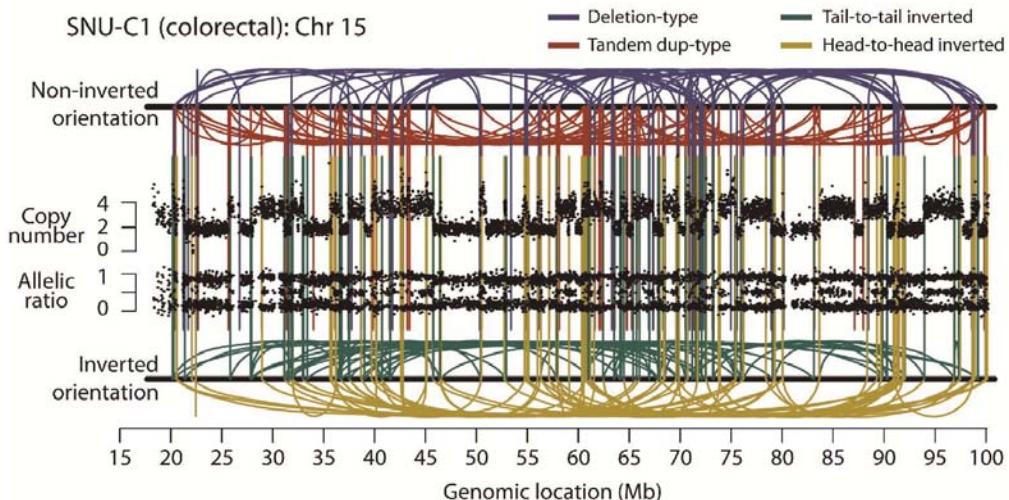


Figura 6. Representació del cromosoma 15 afectat per cromotripsi. Figura adaptada de l'article Stephens *et al.* 2011.

Estudis previs van observar que la cromotripsi es trobava pràcticament en totes les cèl·lules tumorals, fet que va suggerir que es donava en estadis tumorigènics inicials desenvolupant i produint una progressió del càncer (Stephens *et al.*, 2011; Rausch *et al.*,

2012). També es va associar la cromotripsi a una baixa supervivència dels pacients, sent d'aquesta manera, un possible marcador pronòstic per a formes agressives de càncer. També es va poder observar que en alguns càncers com la leucèmia mieloide aguda o el meduloblastoma, la cromotripsi també anava associada a alteracions al gen TP53, suggerint que la cromotripsi es dóna en contextos específics, conjuntament amb altres alteracions (Northcott *et al.*, 2012; Rausch *et al.*, 2012).

La raó per la qual la cromotripsi esdevé, encara és desconeguda, tot i que, gràcies a anàlisis computacionals, s'ha pogut detectar regions de repeticions de 2-4 nucleòtids (microhomologies) on els punts de trencament es donen amb més recurrència i que permet unions entre aquests segments gràcies la reparació de fragments d'ADN no homòloga, NHEJ. A part d'aquesta explicació, també s'ha proposat altres. Algunes explicacions són que la cromotripsi es dóna quan els cromosomes estan condensats en el moment de la mitosi: aquesta hipòtesi explicaria perquè els trencaments es troben tant a prop l'un de l'altre. Altres hipòtesis són la radiació ionitzant que actua quan els cromosomes estan condensats, cromotripsi deguda a l'escurçament dels telòmers, la unió dels caps dels cromosomes i la posterior reorganització dels fragments; degut a la compactació prematura dels cromosomes on la replicació de l'ADN no s'ha finalitzat i es produeix una trencament del material genètic (Meyerson and Pellman, 2011), o degut a la creació de micronuclis causats per un empaquetament tardà i un subseqüent dany a l'ADN (Crasta *et al.*, 2012).

A part de publicacions on s'analitza la cromotripsi en un gran nombre de tumors també s'ha estudiat la cromotripsi en ADN germinal. Tot i així, es creu que el procés pel qual es dóna la cromotripsi en cèl·lules canceroses i en cèl·lules germinals no és el mateix, donat que la cromotripsi "constitutiva" que es dóna en cèl·lules germinals provoca regions duplicades i insercions, dos reorganitzacions estructurals que no es donen en la cromotripsi en cèl·lules canceroses on la pèrdua de material genètic és més comú.

Per identificar reestructuracions de l'ADN provinents d'una cromotripsi i no d'una acumulació al llarg del temps d'alteracions estructurals es van publicar diferents definicions que podien diferenciar aquests dos esdeveniments. En dades provenents de *microarrays* de número de còpies, es va definir que es requerien més de 10 canvis en el número de còpies que alternessin el seu perfil de còpies en un mateix cromosoma. Malauradament, alguns càncers poden acumular elevades quantitats d'alteracions estructurals i en cromosomes concrets al llarg del temps, fet que podria fer pensar amb cromotripsi (Bignell *et al.*, 2007). Per tant, utilitzar els *microarrays* de número de còpies amb aquesta definició és una bona opció per detectar cromotripsi tot i que s'ha d'anar amb molt de compte de no sobreestimar

cromotripsi quan realment és una acumulació d'alteracions estructurals en el temps. Per tal de ser més acurats i gràcies a les noves tecnologies de seqüènciació es van descriure nous criteris per identificar la cromotripsi. Es van descriure 6 criteris per a l'identificació de la cromotripsi utilitzant dades provinents Seqüènciació completa del genoma (Korbel and Campbell, 2013) (**Figura 7**):

- Cluster de punts de trencament.
- Oscil·lació en l'estat del número de còpies.
- Pèrdues intercalades amb retenció d'heterozigositat.
- Afectació d'un sol haplotip.
- Aleatorietat de l'ordre dels fragments i la seva unió.
- Habilitat per seguir un cromosoma derivatiu.

Cluster de punts de trencaments

Els punts de trencament que es donen per cromotripsi acostumen a donar-se en regions d'un tamany aproximadament de 50kb seguits de regions de l'ADN intactes. En aquesta regió alterada acostuma a haver-hi entre 5-10 punts de trencament. Encara que en models progressius de reorganització de l'ADN es poden donar esdeveniments semblants a la cromotripsi en regions fràgils del cromosoma, la cèl·lula hauria de tenir "memòria" per recordar on s'ha realitzat el trencament de l'ADN en la replicació cel·lular anterior.

Oscil·lació en l'estat del número de còpies

Un altre criteri per la cromotripsi és la oscil·lació en l'estat de número de còpies, en el qual el número de còpies oscil·la entre dos estats (per exemple normal i pèrdua). En el cas que una reestructuració del cromosoma no provoqui oscil·lació de l'estat del número de còpies on hi ha més de dos estats de número de còpies diferents es pot dir que el punts de trencament s'han donat a causa d'un model progressiu i no per una cromotripsi.

Pèrdues intercalades amb retenció d'heterozigositat

Freqüentment la cromotripsi es basa en una pèrdua massiva de segments i, com s'ha dit en els anteriors criteris, amb regions disòmiques intercalades. Quan una regió ha patit una cromotripsi les regions perdudes també perden heterozigositat però les regions disòmiques mantenen l'heterozigositat. Per tant, l'heterozigositat del material genètic en aquesta regió també serà intercalada i mai una regió perduda podrà tornar a recuperar l'heterozigositat. En un model progressiu, es podrien trobar regions disòmiques amb pèrdua d'heterozigositat, fet que fa pensar en dues alteracions estructurals progressives (primer una pèrdua de la regió i posteriorment una duplicació d'aquesta).

En casos amb 4 còpies de tots els cromosomes, o poliploides, el criteri de pèrdues interescalades amb retenció d'heterozigositat s'ha d'utilitzar amb cautela, donat que les regions amb un número de còpies menor no té perquè haver-hi pèrdua d'heterozigositat, però sí una contribució al·lèlica diferent en els segments cromosòmics perduts.

Afectació d'un sol haplotip

Un altre criteri per diferenciar la cromotripsi de l'acumulació gradual d'alteracions estructurals al llarg del temps és quantes còpies parentals (haplotips) han estat afectades. Donat que la cromotripsi succeeix en un sol esdeveniment estructural, tots els punts de trencament es donen en un mateix haplotip, condició que no es dóna quan parlem d'una acumulació d'alteracions progressiva on els punts de trencament es poden donar en diferents haplotips.

Aleatorietat de l'ordre dels fragments i la seva unió

La cromotripsi genera diferents fragments cromosòmics, els quals s'uneixen entre ells aleatoriament gràcies al procés de reparació de l'ADN de doble cadena. Per tant, les unions entre l'inici i el final dels fragments són aleatoris. L'orientació dels fragments i la unió dels extrems dels fragments origina diferents alteracions, com pot ser delecions (extrem final cap a l'inicial), duplicacions (extrem inicial cap al final), o inversions (extrems d'inici a inici o de fi a fi). En un esdeveniment cromotríptic les orientacions donades per les unions del material genètic es troben uniformement distribuïts i els fragments es troben localitzats de manera aleatòria en el cromosoma resultant. Aquest criteri també té en compte si les reorganitzacions estructurals són intracromosòmiques o intercromosòmiques. En models progressius aquesta aleatorietat de les unions dels fragments no s'observa. En altres reorganitzacions estructurals com el *breakage-fusion-bridge cycles* (BFB) es va observar que predominaven més les inversions i, per contra, en regions fràgils del cromosoma predominaven més les delecions que altres reorganitzacions estructurals (Campbell *et al.*, 2010).

Habilitat per seguir en un cromosoma derivatiu

Si tots els fragments de la cromotripsi s'han pogut detectar, és possible poder construir el cromosoma derivatiu resultant i saber, per tant, l'orientació de cada fragment. Cadascun d'aquests fragments, ha de començar amb l'inici d'una reorganització i acabar amb un final d'un segment d'una reorganització estructural. Davant d'una cromotripsi, el que s'observarà en el genoma de referència és una alternativitat dels extrems de les lectures del genoma (*reads*). En models de reorganització estructural progressiva, aquest criteri no es

manté, donat que alguns segments es poden reutilitzar trencant aquesta alternança dels extrems dels reads.

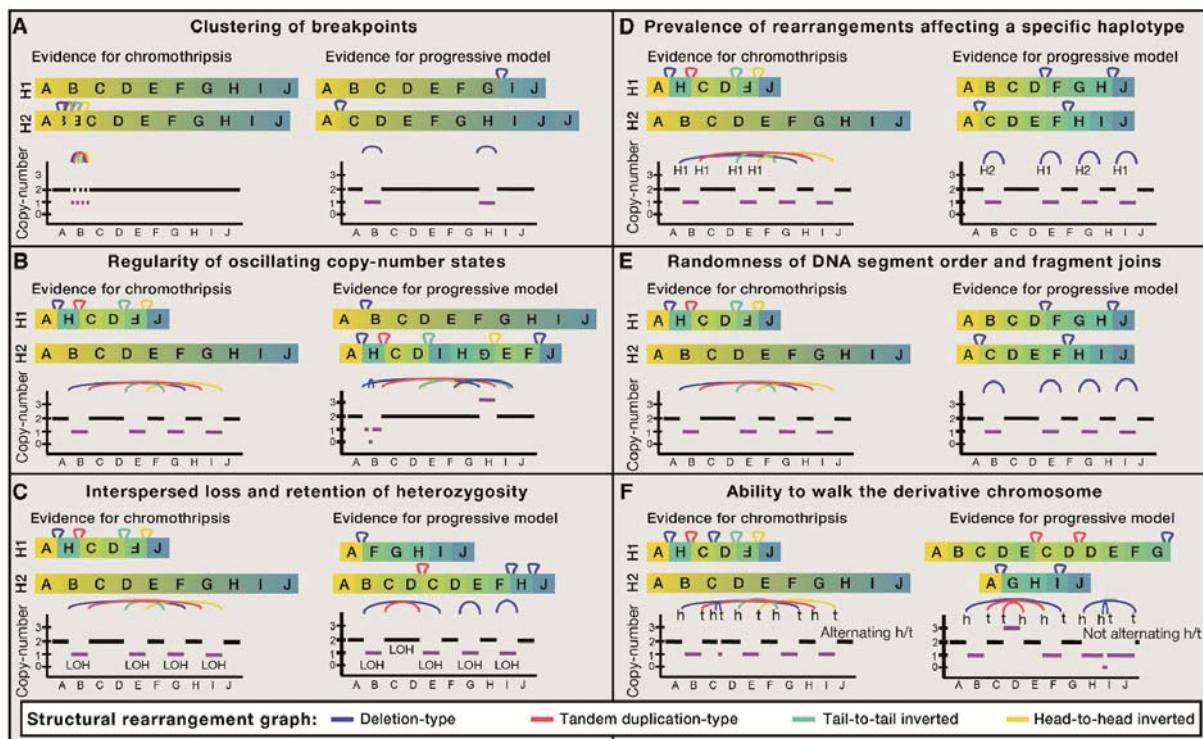


Figura 7. Criteris per a la detecció de la cromotripsi comparat amb el model progressiu d'adquisició d'alteracions. A) Cluster de punts de trencament. B) Oscil·lació en l'estat del número de còpies. C) Pèrdues intercalades amb retenció d'heterozigositat. D) Afectació d'un sol haplotip. E) Aleatorietat de l'ordre dels fragments i la seva unió. F) Habilitat per seguir en un cromosoma derivatiu. Figura adaptada de l'article Korbel & Campbell, 2013.

Aquests 6 criteris són una gran eina per discernir entre reorganitzacions estructurals que es donen al llarg del temps o que es donen en un sol esdeveniment. Ara bé, no tots els criteris es poden utilitzar en tots els càncers. Per exemple, en càncers amb una elevada inestabilitat cromosòmica aquests criteris no serien útils donat que les alteracions estructurals adquirides al llarg del temps podrien emmasclarar una cromotripsi. La heterogeneïtat tumoral i la ploidia també poden afectar en la detecció de la cromotripsi. Per tant, aconseguir millors criteris per a la definició de cromotripsi continua sent un repte. No obstant, en càncers on és possible utilitzar aquests criteris, s'aconsella que per diferenciar la cromotripsi d'una acumulació de reordenaments progressiu, es compleixin un mínim de dos dels sis criteris.

3.1.4. Cromoplèxia

Al 2013, Baca i col·laboradors (Baca *et al.*, 2013) van observar que els casos amb càncer de pròstata analitzats per seqüenciació completa del genoma (WGS) presentaven moltes translocacions i delecions que es localitzaven de manera interdependent, molt diferent del que succeïa davant d'una cromotripsi. Les reorganitzacions que van trobar, anomenades cromoplèxia, eren reestructuracions complexes amb unions molt precises als punts de trencament o amb pèrdues de material genètic en les unions, anomenades delecions ponts. La cromoplèxia, com la cromotripsi, pot generar fusions d'oncogens i disruptió de diferents gens que es trobin en els punts de trencament. En l'estudi van trobar en el grup de casos que una gran majoria d'ells contenia una fusió dels gens *TMPRSS2-ERG* deguda a una reorganització cromoplèxica.

Encara que la cromotripsi i la cromoplèxia són dos fenòmens que provoquen un trencament aleatori del material genètic amb un baix número de còpies i causat normalment per la NHEJ, alguns aspectes els difereixen entre ells. La principal diferència entre aquests dos esdeveniments és l'afectació en el nombre de cromosomes: la cromotripsi només afecta d'un o dos cromosomes mentre que la cromoplèxia afecta de tres o més cromosomes, combinant diferents segments dels cromosomes i produint nous cromosomes derivatius. En la cromotripsi es donen centenars de trencaments, mentre que en la cromoplèxia es donen desenes de trencaments. Un altre aspecte és el nombre d'esdeveniments necessaris que es requereix per causar cadascun dels fenòmens. Totes les reorganitzacions estructurals de la cromotripsi es donen en un sol esdeveniment. La cromoplèxia, per altra banda, es pot donar en més d'un esdeveniment detectant d'aquesta manera alteracions clonals i subclonals. S'ha observat també que les causes més freqüents de la cromotripsi són degudes a l'estrés replicatiu i errors mitòtics com la compactació prematura del material genètic o la formació de micronuclis. La cromoplèxia, en canvi, es creu que està més relacionada a dany a l'ADN induït per factors d'unió de la transcripció (TFB) (Shen, 2013). La cromoplèxia per tant, està més relacionada a regions de transcripció activa i de cromatina oberta (**Figura 8**).

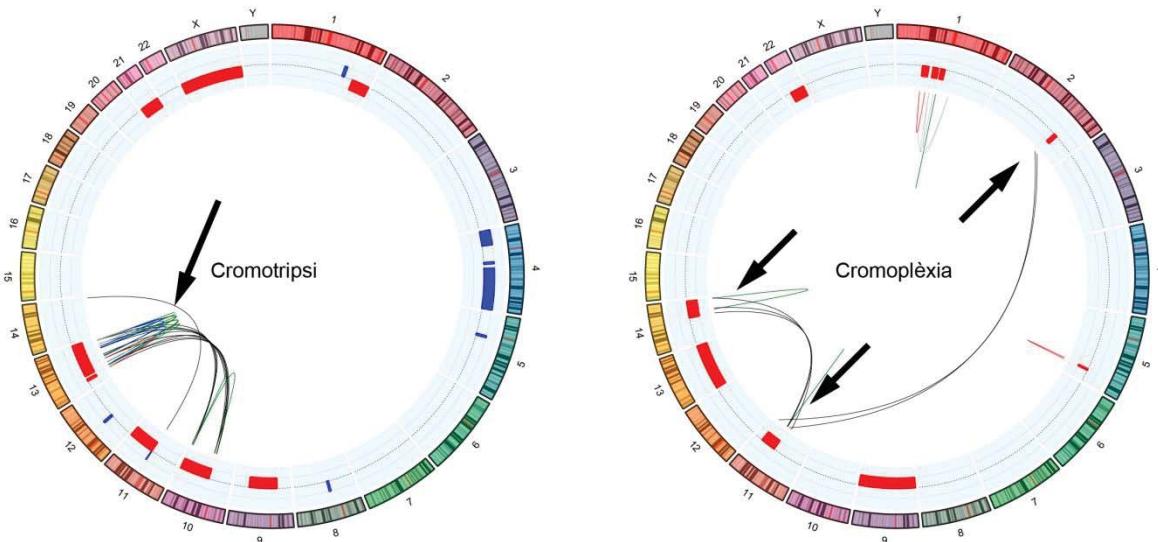


Figura 8. Exemples de dos tumors afectats per cromotripsi i cromoplèxia. Els esdeveniments catastròfics es troben marcats amb una fletxa. A l'interior les alteracions estructurals (arcs negres: translocacions; vermells: deleccions; blaus: insercions; grisos: inversions; verds: sense informació), a l'exterior les CNA (vermell: pèrdues; blau: guanys).

4. Mètodes de detecció d'alteracions genètiques

El primer anàlisi del genoma va ser publicat per Walter Fleming l'any 1882 on describia la composició dels cromosomes i la mitosi. Fins a data d'avui, les noves tecnologies de detecció del genoma han avançat i millorat exponencialment, des d'un cariotip on només es podia observar els cromosomes i les translocacions, pèrdues i guanys de gran tamany sense saber amb exactitud quina regió concreta era, pintats de cromosomes per detectar cada cromosoma, tècniques de FISH per seleccionar la regió del cromosoma d'interès, seqüenciació Sanger seqüenciant petites regions d'interès fins a les tècniques de seqüenciació de nova generació actuals (NGS). Com més avançaven les tècniques de detecció d'alteracions genètiques també augmentava la resolució, arribant fins a dia d'avui on es pot observar a resolució de parells de base no només les mutacions en zones tant codificant com no codificant, sinó també quines regions s'han perdut, s'han guanyat o s'han reorganitzat i en quina posició exacta succeeix aquesta alteració i utilitzant només una sola tècnica, la seqüenciació del genoma complet (WGS). Gràcies als avenços en les tècniques de detecció d'alteracions genètiques també s'ha pogut observar un gran creixement en el nombre de publicacions que descriuen noves alteracions en el genoma, en diferents malalties, les quals no s'havien pogut observar en el passat, degut a la falta d'un bon mètode de detecció i la seva resolució (**Taula 1**).

Taula 1. Comparació entre tècniques moleculars genòmiques.

Tècnica	Resolució	Regió estudiada	CNA	LOH	Mutacions i indels	Reordenaments
Cariotip	Baixa	Genoma	x			x
FISH	Molt alta	Locus específic	x			x
Sanger	1 bp	Genoma			x	x
SNParray	Alta	Genoma	x	x		
CGHa		Genoma	x			
WES	1 bp	Exoma	x	x	x	\$
WGS	1 bp	Genoma	x	x	x	x
MP-WGS	1 bp	Genoma				x

WES: Seqüenciació completa d'exoma; WGS: Seqüenciació completa del genoma; MP-WGS: Seqüenciació completa Mate-Pair del genoma; bp: parells de bases; \$ Encara que no sigui una tècnica idònia, es poden detectar alguns reordenaments.

Les tècniques de NGS són tècniques d'alt rendiment (de l'anglès *high-throughput*), permeten analitzar milions de seqüències localitzades en tot el genoma o regions d'interès prèviament seleccionades. Una de les noves aportacions que permeten les tècniques NGS és les seqüències d'extrems parejats (PE). Les seqüències PE seqüencien cada segment per cadascun dels seus extrems i s'alineen com a parelles de lectures en un genoma de referència. Aquesta nova metodologia permet ser més acurat amb la tècnica i l'habilitat de poder detectar petites insercions i delecions que no es podien detectar amb tècniques de seqüenciació de primera generació. Amb aquesta tècnica també es pot eliminar el duplicats deguts a la PCR, un artefacte comú per l'amplificació a l'hora de fer la preparació de les llibreries. Cal destacar, però, que la quantitat de dades que s'obtenen de les tècniques NGS és tant gran que es requereix, primer de tot, d'una potència computacional molt elevada i també un desenvolupament cada cop més complex d'algoritmes per poder analitzar totes les dades de la manera més ràpida i acurada possible, obtenint a la vegada tota la informació possible de les dades obtingudes (**Figura 9**).

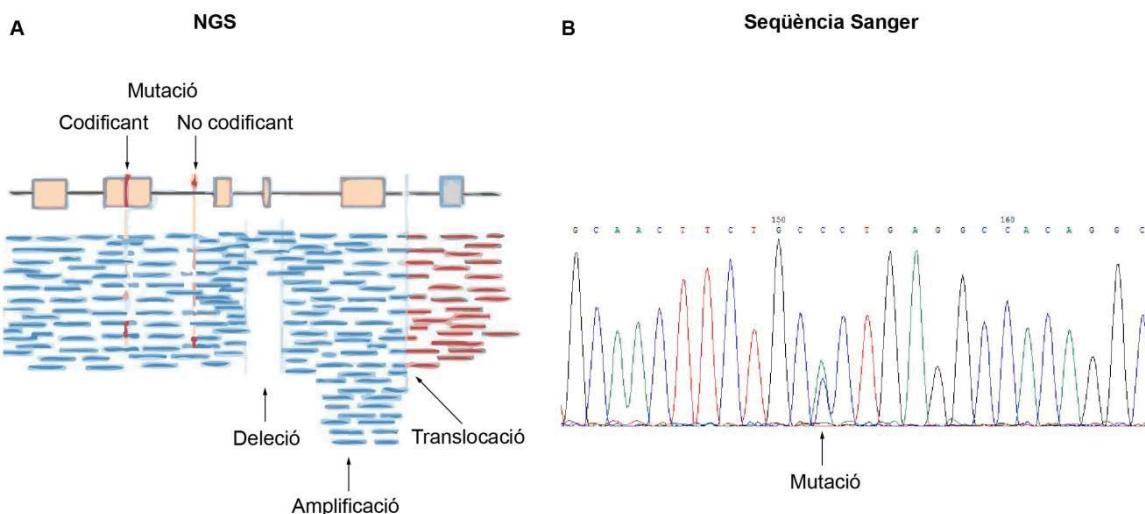


Figura 9. Representació de les lectures de seqüències realitzades en un genoma. A) Les lectures per NGS permeten detectar tant mutacions com delecions, amplificacions i alteracions estructurals. B) Les seqüències Sanger permeten detectar fàcilment mutacions en >15% de freqüència, però també translocacions i insercions amb primers adeqüats. Figura adaptada de l'article Nakagawa et al. 2015.

4.1. Cariotip i FISH

El cariotip és una tècnica genètica per a la detecció del patró cromosòmic d'un organisme. Per a la realització de la tècnica, les cèl·lules s'han de tractar per tal que es parin en metafase i hi hagi una bona separació cromosòmica. Posteriorment, els cromosomes s'hauran de tenyir per tal de poder diferenciar cadascun dels cromosomes. Amb la tinció s'aconseguirà observar els 44 cromosomes autosòmics i els dos sexuals ben aïllats entre ells. La tècnica del cariotip permetrà detectar anormalitats en el patró cromosòmic d'un organisme podent detectar translocacions, guanys o pèrdues de segments d'un cromosoma o de cromosomes sencers.

La FISH és una tècnica de detecció d'ADN directament sobre cromosomes metafàsics i nuclis interfàsics utilitzant una o més sondes marcades amb fluorocroms específics. Les sondes més utilitzades són: i) sondes centromèriques que hibriden als centròmers i s'utilitzen per observar alteracions en el nombre de còpies; ii) sondes de locus específic utilitzades per detectar alteracions en el nombre de còpies; iii) sondes de pintat cromosòmic podent marcar tot un cromosoma sencer, útils per observar alteracions estructurals de difícil detecció; iv) sondes de fusió que s'utilitzen per poder detectar una translocació específica utilitzant dos fluorocroms de colors diferents i observant la seva superposició, i v) finalment sondes de *break-apart*, utilitzades per detectar reorganitzacions estructurals. Tant les sondes de *break-apart* com les sondes de fusió permeten detectar

diferents reordenaments. Les dos sondes de *break-apart* necessàries per a la detecció d'un reordenament es localitzen a cada extrem d'un dels punts de trencament, molts properes entre elles. Si existeix un reordenament s'observarà una separació d'aquestes dues sondes. Amb les sondes *break-apart* es podrà detectar un punt de trencament del reordenament però es desconeixerà amb quin fragment es reordena. En les sondes de fusió cada una de les sondes es localitzen properes als diferents punts de trencament dels cromosomes. Quan s'observa una translocació s'observarà que les dues sondes s'uneixen en un mateix punt. Les sondes de fusió, per tant, permeten detectar les dues regions involucrades en una translocació (**Figura 10**).

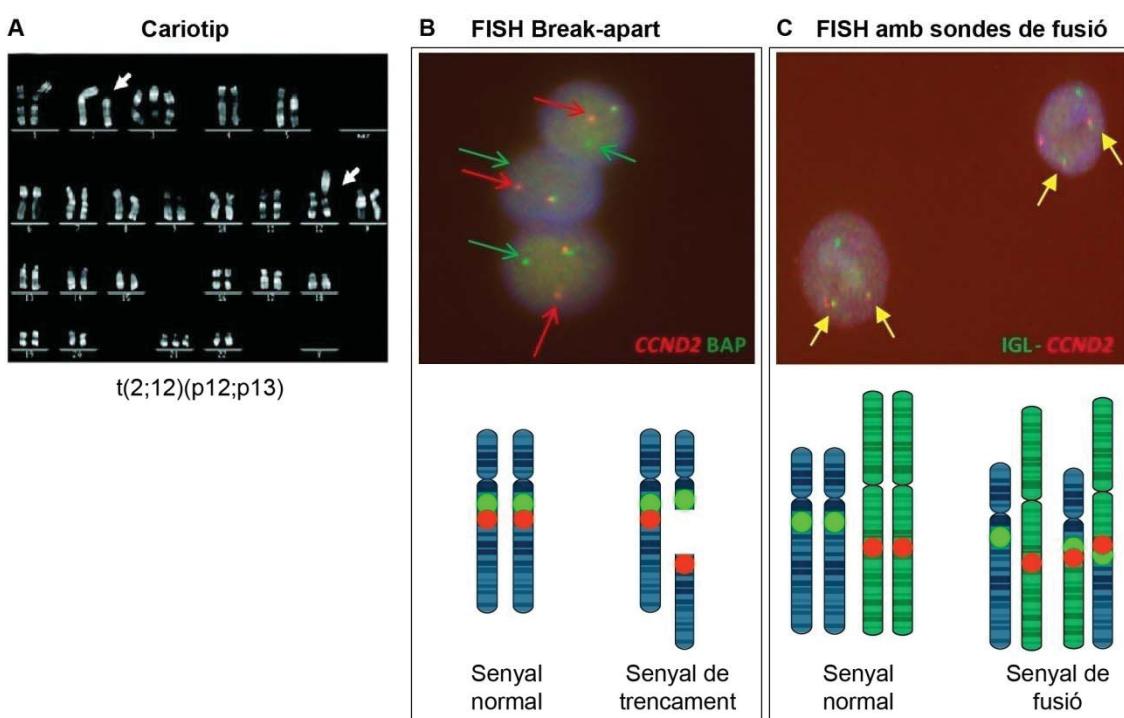


Figura 10. Detecció de la translocació del gen *CCND2* utilitzant A) cariotip i FISH amb B) sondes *break-apart* i C) sondes de fusió. Figura adaptada dels articles Gesk et al. 2006 i Salaverria et al. 2013.

4.2. Microarrays de còpia gènica

Els arrays o *microarrays* de còpia gènica són uns dispositius sòlids els quals se'ls uneix fragments d'ADN de totes les regions dels cromosomes que es vulguin investigar, analitzant, d'aquesta manera, moltes regions del genoma en un sol experiment. La seva tecnologia es basa en un xip de seqüències d'ADN, anomenades sondes, on s'uneixen fragments d'ADN. La hibridació entre la sonda i el fragment d'ADN provoca una fluorescència que, mitjançat anàlisi d'imatge, permet detectar la quantitat de cada fragment d'ADN investigat. A diferència de les tècniques de cariotip i FISH on es necessiten cèl·lules en divisió per a la realització de la tècnica, els *microarrays* de còpia gènica només

necessiten ADN. Els *arrays* de CGH o *microarrays* d'hibridació genòmica comparada són un tipus d'*array* de còpia gènica que permet detectar guanys i pèrdues en el genoma. La tecnologia d'aquest *array* permet hibridar dues mostres a la vegada, generalment una mostra tumoral i una mostra control del mateix pacient, cadascuna d'elles marcada amb un fluorocrom diferent. Un software d'anàlisi d'imatge compara les dues fluorescències de les mostres i n'extreu el resultat dels guanys i les pèrdues d'una mostra respecte l'altra. Els SNP *arrays* són un altre tipus de *microarrays* de còpia gènica que permet detectar guanys i pèrdues, però a diferència dels arrays CGH, els SNP *arrays* també permeten detectar LOH i CNN-LOH. La tecnologia de l'SNP *array* és molt semblant a la del CGH. En aquest cas, unes sondes que contenen polimorfismes de nucleòtids simples o SNPs s'uneixen a un superfície sòlida. Posteriorment s'hibriden diferents fragments d'ADN d'una mostra marcats amb un fluorocrom. El nivells de cada fragment d'ADN es detecten mitjançant softwares d'anàlisi d'imatges (**Figura 11**).

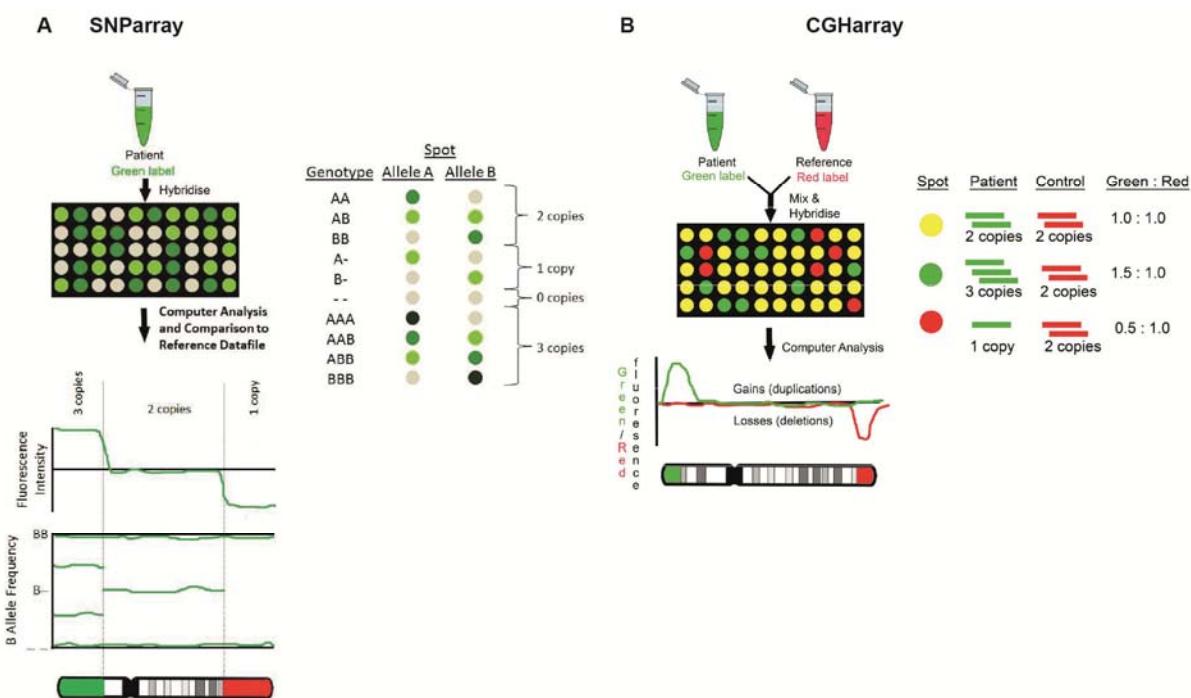


Figura 11. Diferenciació entre tècniques de *microarray* de còpia gènica. A) SNParray. B) CGHarray

4.3. Seqüènciació completa de l'exoma

La Seqüènciació completa de l'exoma (WES) és una tècnica NGS que permet la captura dels exons de tots els gens del genoma. El WES permet detectar les variants al·lèliques en les regions codificant i reguladores. No obstant això, el WES també permet detectar alteracions estructurals que es donen en les regions capturades: insercions, deleccions i fins i tot reorganitzacions estructurals com poden ser guanys i pèrdues o translocacions utilitzant els algoritmes adients (**Figura 12**). Per a la producció d'un WES,

l'ADN de doble cadena s'ha de processar, capturant només els exons del genoma (Warr *et al.*, 2015).

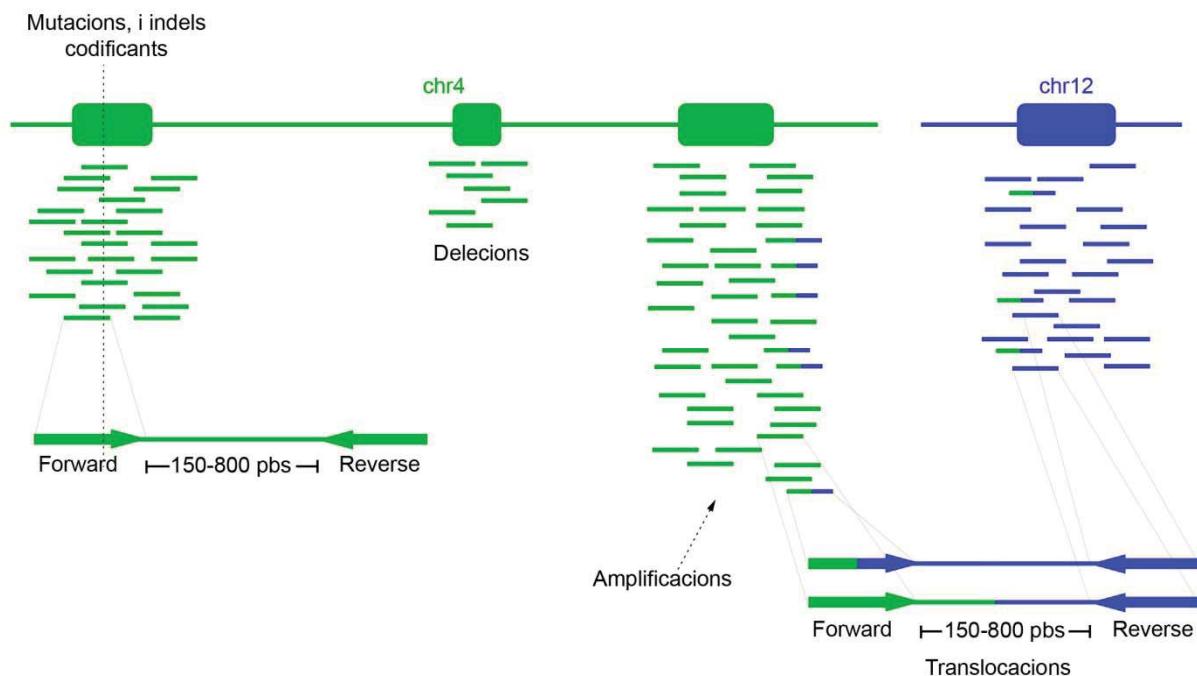


Figura 12. Representació de les lectures de seqüència, la cobertura del genoma i la identificació d'alteracions mitjançant la tècnica de la seqüenciació completa de l'exoma (WES).

4.4. Seqüenciació completa del genoma

La necessitat d'analitzar no només les regions codificant sinó també totes les regions del genoma, va promoure l'aparició d'altres tècniques NGS, desenvolupant d'aquesta manera la tècnica de la Seqüenciació completa del genoma (WGS). El WGS, a diferència del WES, permet analitzar tot el genoma sencer d'un organisme i estudiar totes les alteracions genòmiques que es puguin trobar en el genoma. Al ser una tècnica amb un resolució de parells de bases, una sola tècnica de WGS permet trobar mutacions d'una sola base tant codificant com no codificant, insercions i deleccions petites, però també alteracions de gran tamany com inversions, duplicacions i deleccions i finalment, translocacions o reorganitzacions molt més complexes com són cromotripsis o cromoplèxies. El comptatge del nombre de lectures en cada regió del genoma també permet saber guanys i pèrdues en el número de còpies del material genètic així com també pèrdues d'heterozigositat (**Figura 13**). Per a la preparació d'un WGS, l'ADN es fragmenta aleatoriament en petits segments i es seqüencia cada segment múltiples cops, obtenint una seqüenciació del 99% del material genètic. Si és possible s'acostuma a seqüenciar el genoma d'una mostra tumoral i una genoma d'una mostra control del mateix individu, filtrant d'aquesta manera totes les alteracions germinals o obtenint un resultat més específic de la

mostra tumoral. Degut a l'amplificació de les seqüències per PCR, les lectures contenen errors provocant una mal alineament en zones riques en GC o AT, com poden ser els centròmers i telòmers o les regions amb seqüències repetitives. Les lectures de les seqüències d'aquestes zones són curtes i no és possible el correcte alineament d'aquestes seqüències amb el genoma de referència (Nakagawa *et al.*, 2015).

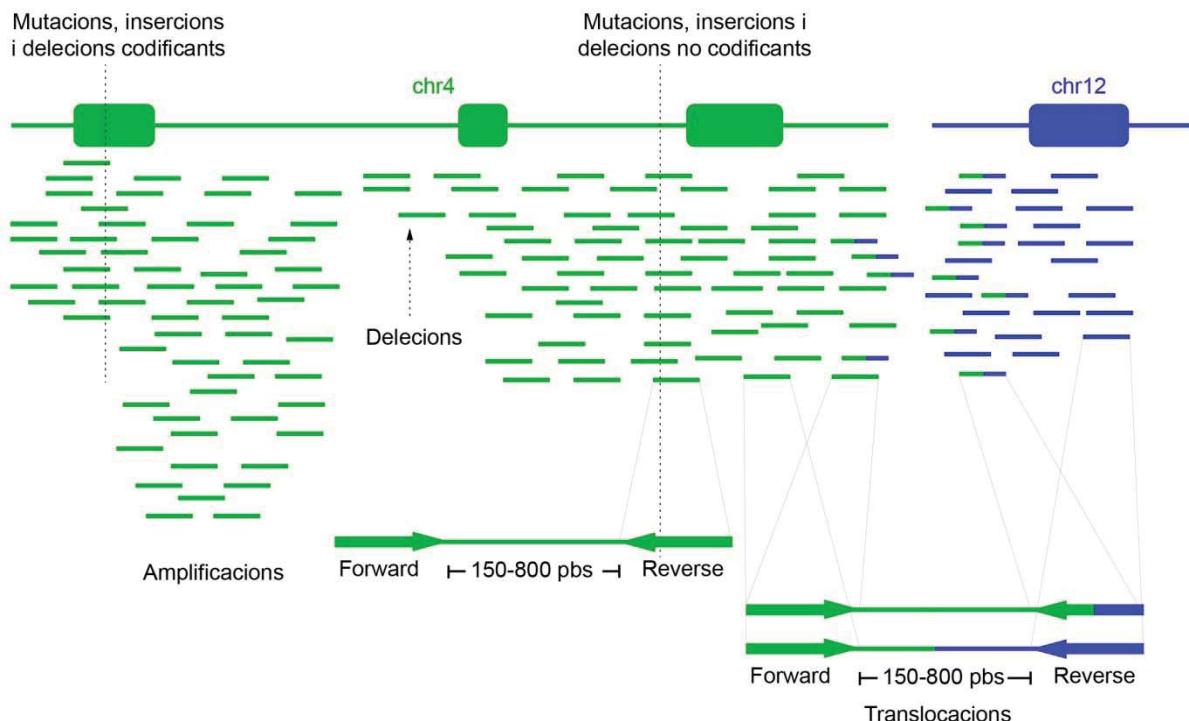


Figura 13. Representació de les lectures de seqüència, la cobertura del genoma i la identificació d'alteracions mitjançant la tècnica de la seqüenciació completa del genoma (WGS).

4.5. Seqüenció completa Mate-Pair del genoma

La tècnica del WGS permet analitzar totes les alteracions genòmiques d'un organisme o d'una cèl·lula tumoral, però no permet un correcte alineament en regions repetitives, i a més, el cost econòmic, de temps i computacional és elevat. La tècnica de Seqüenciació completa Mate-Pair del genoma (de l'angles *Mate-Pair Whole Genome Sequencing*, MP-WGS) és una tècnica de NGS on el material genètic es fragmenta mecànicament o per digestió en segments molt més grans que els de WGS, fragments de kilobases en comptes de centenars de bases. Els extrems dels fragments es circularitzen i es marquen amb biotina, es fragmenta en segments de 500 parells de bases i es recopilen els fragments de biotina gràcies a les perles magnètiques d'estreptavidina. Finalment, els extrems d'aquests fragments són seqüenciats i alineats en un genoma de referència.

El MP-WGS és una tècnica de NGS utilitzada per analitzar alteracions estructurals d'una manera més acurada, donat que la distància entre les lectures de les seqüències permet solucionar els problemes en els alineaments de les seqüències en regions repetitives. Els MP-WGS, però, no és una tècnica útil per a la detecció de mutacions donat que la cobertura de cada base del genoma és més baixa (**Figura 14**). El MP-WGS permet analitzar totes les alteracions estructurals que es puguin trobar en el genoma utilitzant una quantitat menor de material genètic, aconseguint una cobertura menor per base però també reduint el cost econòmic, computacional i el temps d'anàlisis de les dades obtingudes (Gao, Smith and Gilbert, 2015).

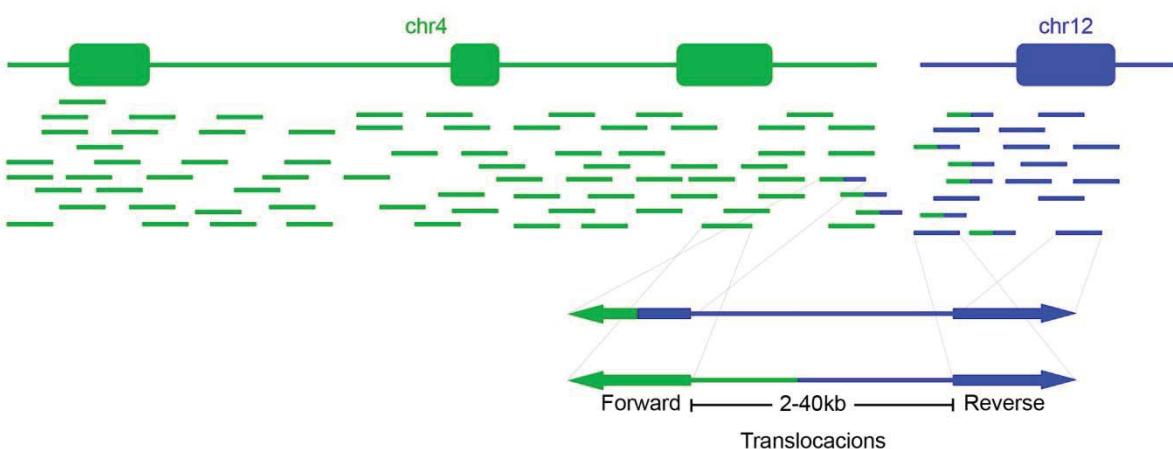


Figura 14. Representació de les lectures de seqüència i la identificació d'alteracions mitjançant la tècnica de la seqüenciació completa Mate-Pair del genoma (MP-WGS).

5. Limfomes no-Hodgkin de cèl·lula B

Les neoplàsies hematològiques engloben un gran nombre de diferents malalties que afecten diferents òrgans limfoides, la sang o el moll de l'ós i amb diferents característiques clíniques. Per tal d'aconseguir una bona classificació, les neoplàsies hematològiques es classifiquen actualment segons la seva morfologia, clínica, genètica i immunofenotip (Swerdlow, World Health Organization and International Agency for Research on Cancer, 2017). Una de les branques de la classificació es dedica exclusivament a les neoplàsies limfoides, tumors clonals de cèl·lules B, T o NK, tant madures com immadures.

Les neoplàsies limfoides o limfomes es poden subclassificar en limfomes Hodgkin o no-Hodgkin, on la majoria dels limfomes de cèl·lula B, al voltant del 90%, es troba inclòs en aquest darrer grup (Swerdlow, World Health Organization and International Agency for Research on Cancer, 2017). Els limfomes de cèl·lula B no-Hodgkin engloben un gran grup

de neoplàsies que deriven de les cèl·lules B de diferents estadis de diferenciació. L'estadi de diferenciació de cèl·lula B i les alteracions genètiques primàries que han adquirit els limfomes són útils per discriminat de quin tipus de limfoma es tracta. El Limfoma de Cèl·lules del Mantell (MCL) i la Leucèmica Limfàtica Crònica (CLL) són dos subtipus del limfoma de cèl·lula B els quals s'estudiaran en aquesta tesi doctoral.

5.1 Diferenciació de cèl·lula B i limfomagènesi

L'hematopoiesi és un procès biològic pel qual a partir de les cèl·lules mare, es generen totes les cèl·lules diferenciades del sistema hematopoiètic. El desenvolupament de les cèl·lules hematològiques comença a partir d'unes cèl·lules progenitors multipotents que es van diferenciant cap a cèl·lules mieloides i limfoides. El llínatge cel·lular limfoide inclou tant cèl·lules B, T com NK (Monroe and Dorshkind, 2007). Cadascun dels estadis de maduració conté un immunofenotip i una expressió de marcadors de superfície específica. La diferenciació de cèl·lula B està orientada a la producció de totes les cèl·lules B amb un ampli espectre de receptors d'antigens. El primer procès en el desenvolupament de la cèl·lula B és la producció del receptor d'antigens de la cèl·lula B (BCR) que es dóna al moll de l'ós. Per a la seva producció, els segments variables (V), de diversitat (D) i d'unió funcional (J) de les immunoglobulines (IG) es recombinen aleatoriament donant una estructura del BCR única; les regions pesades de cadena variable contenen els tres segments i les regions lleugeres només dos. Dos d'aquestes cadenes pesades o lleugeres s'uneixen covalentment amb un segment constant (C) formant finalment una immunoglobulina funcional, l'estructura del BCR que reconeixerà un antigen específic (Pieper, Grimbacher and Eibel, 2013). Quan les cèl·lules B primerenques expressen a la seva superfície una IG i aquestes no reaccionen contra auto-antigens, deixen el moll de l'ós per passar al torrent sanguini. Aquests limfòcits circulen pel torrent sanguini i teixits limfoides secundaris per tal de reconèixer un antigen específic. Quan una cèl·lula B detecta un antigen, aquesta cèl·lula comença un procés de maduració dins dels ganglis limfàtics mitjançant la resposta de cèl·lula T dependent o per una via independent.

En la resposta dependent de cèl·lula T, l'activació de la cèl·lula B es dóna en les regions fol·liculars dels ganglis limfàtics, generant una reacció de centre germinal (CG). En la zona fosca del fol·licle, la cèl·lula B activada entra en contacte amb les cèl·lules T helper presentant-li l'antigen, provocant una recombinació de canvi de classe (CSR) i iniciant el procés d'hipermutació somàtica (SHM) (Klein and Dalla-Favera, 2008). La CSR provoca el canvi de la regió constant de la IG cap a isotips amb funcions més específiques: IGM o IGD cap a IGG, IGA o IGE. La SHM, en canvi, provoca un augment de la diversitat de la regió

variable, acumulant un gran nombre de mutacions introduïdes pel mecanisme AID, seguit per un mecanisme de reparació d'error de nucleòtids. Un cop les cèl·lules expressen una nova IG passen a la zona clara del fol·licle, testant si el receptor reconeix algun antigen o si no reconeix autoantigens. Si supera la selecció positiva la cèl·lula surt del CG i es diferenciarà cap cèl·lula B de memòria migrant al torrent sanguini o diferenciant-se cap a cèl·lula plasmàtica i migrant cap a el moll de l'ós.

A part de la resposta dependent de cèl·lula T, les cèl·lules B també es poden activar mitjançant una resposta independent de cèl·lula T que s'origina a la zona marginal dels ganglis limfàtics. Les cèl·lules B activades via zona marginal es diferencien a cèl·lules plasmàtiques, secretant anticossos de baixa afinitat i amb una vida de la cèl·lula més curta (Bortnick and Allman, 2013) (**Figura 15**).

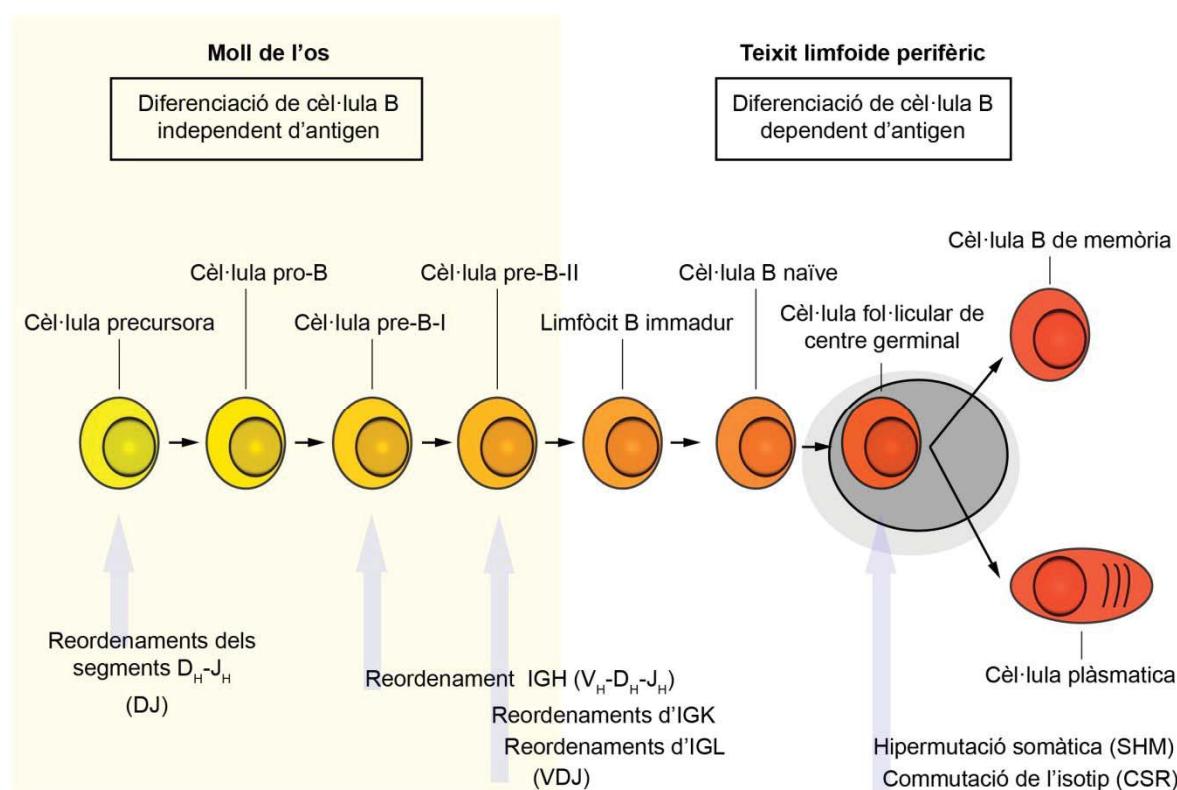


Figura 15. Representació esquemàtica de la diferenciació de cèl·lula B. Figura adaptada de l'article Jares et al. 2007.

Cada estadi de maduració de les cèl·lules B està caracteritzat per un patró d'expressió i una localització en el teixit limfoide específic. Aquestes dues característiques permeten classificar de forma acurada cada tipus de limfoma de cèl·lula B. L'inici d'un limfoma, o limfomagènesi, comença generalment amb un translocació cromosòmica afectant diferents oncogens, provocant una sobreexpressió d'aquests i com a conseqüència, desregulant diferents vies com ara la proliferació, l'apoptosi o el creixement cel·lular.

Aquestes translocacions es donen en els diferents estadis de diferenciació causant la formació de diferents limfomes de cèl·lula B. Tot i haver adquirit una translocació que desreguli el cicle cel·lular, la cèl·lula pot o no continuar la seva maduració fins a estadis més ben diferenciats (Shaffer, Rosenwald and Staudt, 2002). No obstant això, s'ha observat alguns individus sans amb cèl·lules B que presenten aquestes translocacions en un subclon cel·lular sense patir cap tumorigènesi (Lecluse *et al.*, 2009). Aquestes translocacions cromosòmiques doncs, no són suficients per iniciar una progressió tumoral, el clon cel·lular requereix d'altres alteracions secundàries que afectin altres oncogens o gens supressors de tumors.

Tot i que la clínica, la morfologia i l'immunofenotip cel·lular són útils per al diagnòstic dels limfomes de cèl·lula B, les translocacions específiques de cada limfoma són molt útils per a poder diferenciar un limfoma d'un altre (Campo *et al.*, 2011; Morgan *et al.*, 2014). Per un millor diagnòstic en els limfomes que comparteixen diferents característiques, el diagnòstic es complementa amb tècniques més específiques com poden ser mutacions específiques (com *BRAF* en MCL o *MYD88* en LPL), perfils d'expressió gènica, detecció d'hipermutació somàtica o perfil de metilació de l'ADN (Alizadeh *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2017) (**Figura 16**).

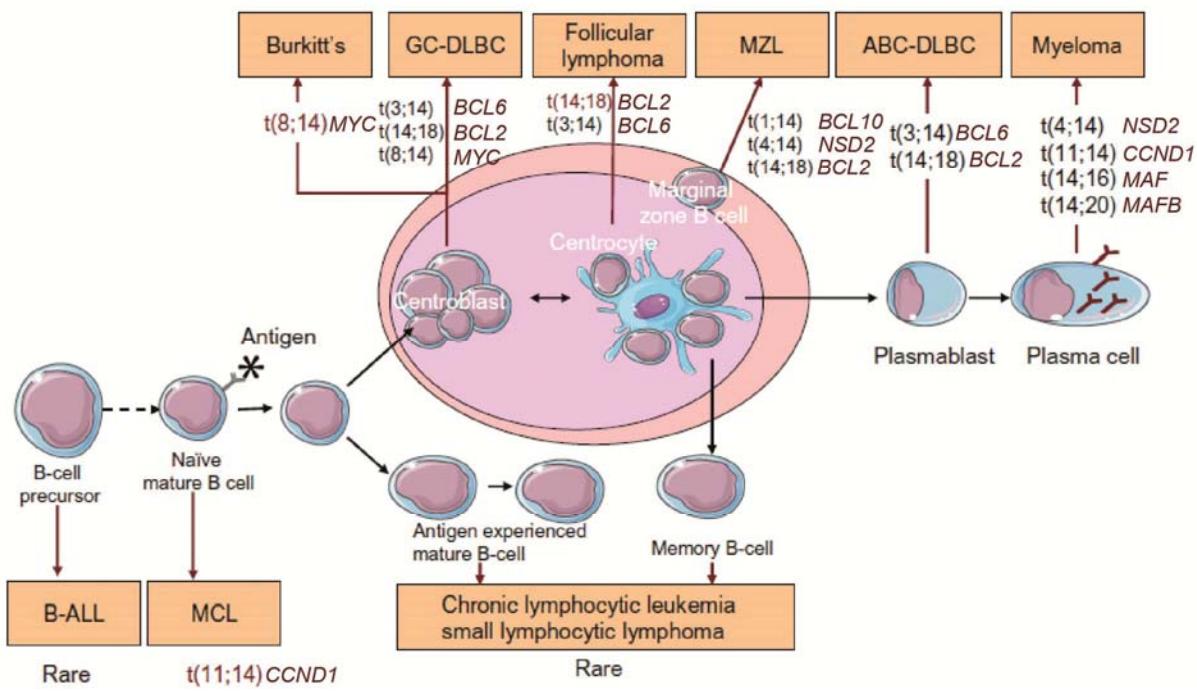


Figura 16. Origen cel·lular de la limfomagènesi segons la neoplàsia limfoide de cèl·lula B i translocacions característiques. Figura adaptada de l'article Morgan et al. 2014.

6. Leucèmia Limfàtica Crònica (CLL)

6.1. Característiques clínico-biològiques

La Leucèmia Limfàtica Crònica és la leucèmia més comú en els adults, amb una incidència de 4-5/100000, una edat mediana al diagnòstic de 71 anys i es dóna més en homes que en dones (2:1). La CLL és una leucèmia de cèl·lules B monoclonal caracteritzada per l'expressió dels marcadors CD5 i CD23 que afecta el moll de l'ós, la sang perifèrica, i a vegades, el ganglis limfàtics i la melsa (Swerdlow, World Health Organization and International Agency for Research on Cancer, 2017). L'origen cel·lular de la CLL encara no està clar. La CLL és una neoplàsia de cèl·lula B madura però es creu que les primeres alteracions ja s'adquireixen abans de la diferenciació cel·lular de cèl·lula B, en les cèl·lules hematopoïètiques (Kikushige *et al.*, 2011). Aproximadament el 50% dels casos de CLL passen a través del CG, es dóna una hipermutació de les IGHV (CLL IGHV-mutat), i s'associen a una malaltia més benigna. Per contra, els casos amb IGHV no mutades (CLL IGHV-no mutat), s'associen a una malaltia molt més agressiva (Damle *et al.*, 1999; Hamblin *et al.*, 1999). Cal destacar que entre un 2-5% dels casos es transformen en un limfoma molt més agressiu anomenat Síndrome de Richter (RS) (**Figura 17**).

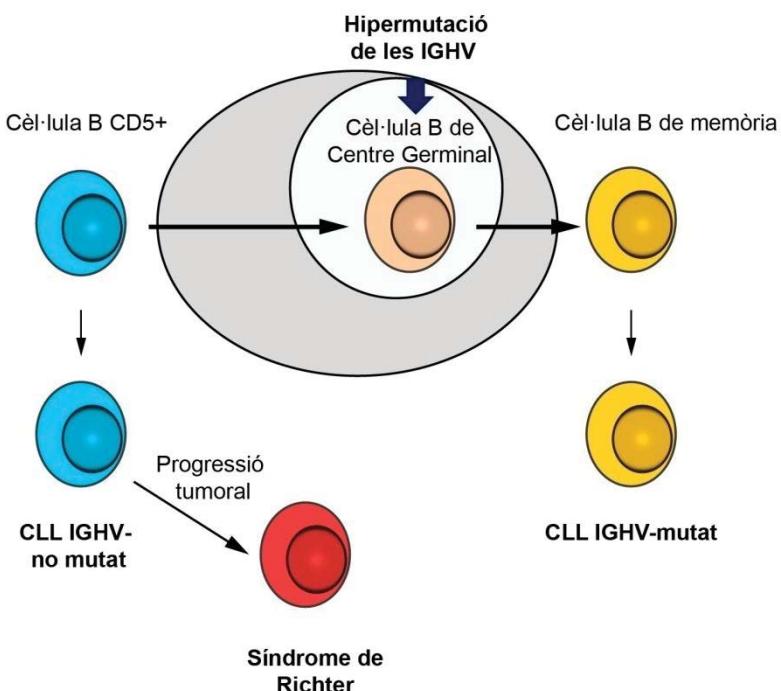


Figura 17. Representació esquemàtica de la diferenciació cel·lular cap a la CLL amb IGHV mutades, no mutades i cap a neoplàsies més agressives.

La CLL és una malaltia molt heterogènia, des de casos indolents, asimptomàtics i sense necessitat de tractament fins a casos molt agressius. El tractament més utilitzat és la

quimioimmunoteràpia combinada amb fludarabina i la ciclofosfamida juntament amb rituximab. També s'utilitza ibrutinib com a tractament, una molècula que inhibeix la via del receptor de cèl·lula B, una via essencial per a la supervivència de la CLL (Wiestner, 2013). Normalment, després del tractament, els casos es curen, tot i que alguns dels casos pateixen recaigudes de la malaltia.

6.2. Alteracions genètiques rellevants de la CLL

Mutacions somàtiques

La CLL presenta diferents alteracions rellevants en el funcionament i progressió del tumor. Recentment i gràcies a les tècniques de NGS, s'han trobat multitud de mutacions en CLL, tot i que poques d'elles s'han trobat freqüents entre els casos. Quan es va observar el número global de mutacions que contenia cada cas es va observar que acumulaven un baix nombre de mutacions (2500 mutacions per cas, aproximadament), unes 0,87 mutacions per megabase (Puente *et al.*, 2015) i entre 2 i 76 mutacions no sinònimes per cas (Wang *et al.*, 2011; Quesada *et al.*, 2012). També es va observar que casos de CLL amb les IGHV mutades presentaven un pronòstic més favorable i acumulaven més mutacions que els casos amb IGHV no mutades (Puente *et al.*, 2015) (**Figura 18**). L'acumulació d'aquestes mutacions s'introdueixen pels errors provinents de la polimerasa η durant l'hipermutació somàtica de la IGHV (Spencer and Dunn-Walters, 2005) i s'acostumen a localitzar en llocs de replicació i heterocromatina (Lawrence *et al.*, 2013), de les quals la majoria són mutacions passatgeres. No obstant això, les mutacions que afecten gens drivers s'acostumen a acumular en el casos CLL IGHV-no mutat (**Figura 18**). Es va obserar que els casos CLL IGHV-mutat que presentaven deleció 13q o que no presentaven cap alteració estructural no presentaven cap mutació en gens driver.

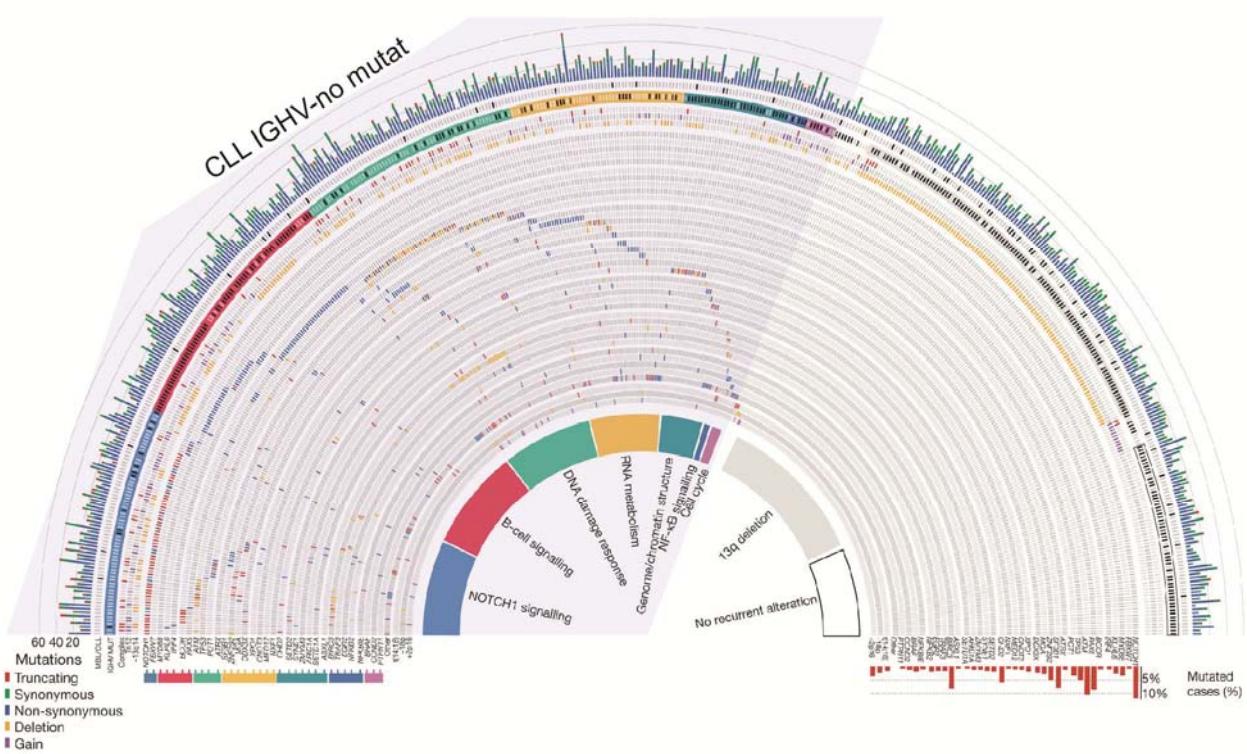


Figura 18. Representació de la distribució de mutacions somàtiques en gens drivers en 506 casos de CLL. Cada columna representa un cas. En blau destacat on es localitzen principalment els casos CLL-IGHV no mutat. Les alteracions es troben marcades segons si són mutacions truncants, sinònimes, no sinònimes, delecions o guanys. Figura adaptada de l'article Puente *et al.*, 2015.

Pel que fa a mutacions en zones codificant, la distribució de mutacions somàtiques varia segons l'estat mutacional de les immunoglobulines (Campo, 2013) (**Figura 19**). Els gens més freqüentment alterats són *SF3B1* en un 8-21% dels casos, un factor implicat en el procés d'*splicing* (Quesada *et al.*, 2012; Puente *et al.*, 2015). Es va observar que les alteracions a *SF3B1* es trobaven associats amb una progressió a la malaltia més ràpida i una supervivència menor i provocaven una desregulació de les vies de la resposta al dany a l'ADN, la via de NOTCH o el manteniment dels telòmers (Wang *et al.*, 2016). Un altre gen freqüentment alterat és *ATM*, mutat en un 6-10% dels casos i relacionat amb la reparació de l'ADN i la regulació del cicle cel·lular (Rossi and Gaidano, 2012); mutacions a *NOTCH1* (8-10% dels casos) on les mutacions es localitzen a la zona N-terminal i al domini PEST, i en la regió 3' no codificant. Aquestes mutacions en la regió no codificant del gen es van poder observar gràcies a la combinació de WGS i RNA-seq i es va observar que provocaven un trencament del domini PEST del gen, fet que provocava una estabilització i acumulació de la proteïna (Puente *et al.*, 2015). Es va observar que les mutacions en *NOTCH1* es trobaven més freqüentment en casos CLL-IGHV no mutat que en casos CLL-IGHV mutat (83% vs 17%) (Rosati *et al.*, 2009; Puente *et al.*, 2015; Fabbri *et al.*, 2017). Es va observar també que l'activació de la via de NOTCH conferia al tumor supervivència cel·lular i resistència a

l'apoptosi (Rosati *et al.*, 2009). També es van trobar mutacions a *TP53* (3-8%), un gen supressor de tumors; mutacions a *POT1* (3-7%) que es van trobar principalment en casos amb IGHV no mutades i que provocaven un mal funcionament de l'activitat telomèrica, o mutacions a *MYD88* (3-4%) que incrementava la secreció de diferents citosines i que només es van detectar en pacients joves (Puente *et al.*, 2011; Ramsay *et al.*, 2013; Martínez-Trillos *et al.*, 2016). A part dels gens freqüentment mutats, s'han detectat altres gens mutats com són *EGR2*, *MED12*, *NFKBIE*, *RPS15* o *SETD2* amb una freqüència menor del 5% (Kämpjärvi *et al.*, 2015; Puente *et al.*, 2015; Mansouri *et al.*, 2015; Ljungstrom *et al.*, 2016; Parker *et al.*, 2016; Young *et al.*, 2017). Estudis de WGS també van detectar mutacions recurrents no codificant que afectaven a un *enhancer* actiu del gen *PAX5*, un factor de transcripció de la cèl·lula B. Es va observar que les mutacions reduïen l'expressió de *PAX5* i contribuïen al desenvolupament tumoral (Puente *et al.*, 2015).

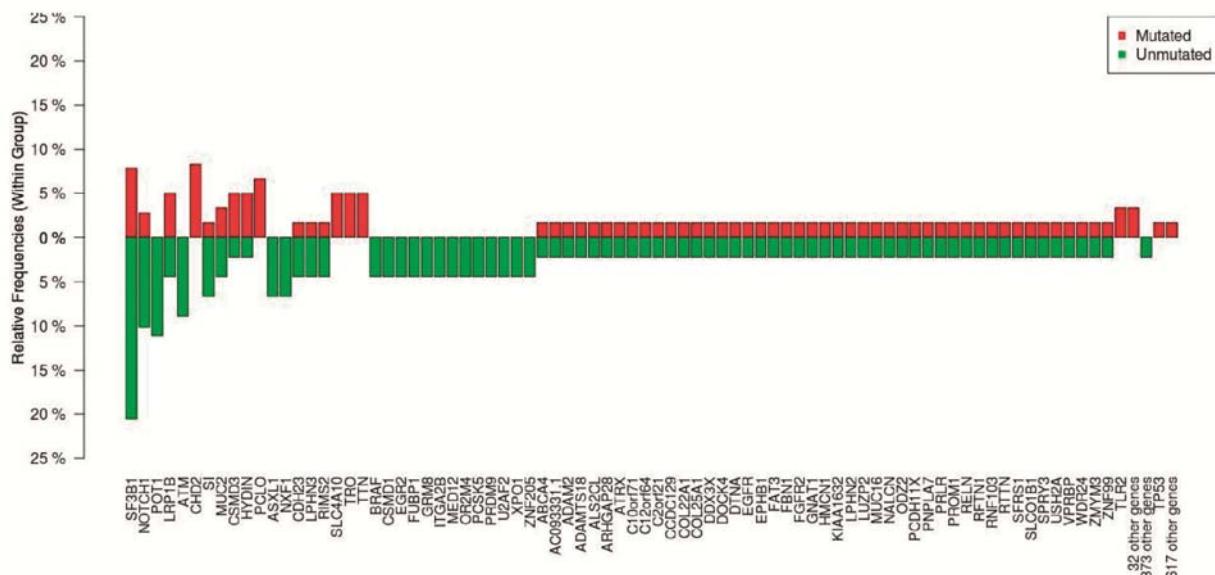


Figura 19. Distribució de les mutacions somàtiques segons l'estat de les immunoglobulines en CLL.
Figura adaptada de l'article Campo, 2013.

Subclonalitat de les mutacions i evolució clonal

La seqüenciació amb una alta cobertura per base va permetre identificar mutacions en els gens com *TP53*, *NOTCH1*, *NFKBIE* i *POT1* entre d'altres amb una freqüència al·lèlica molt baixa. La baixa freqüència al·lèlica va fer pensar que aquestes mutacions es trobaven en petits subclons de la CLL (Rossi *et al.*, 2014; Nadeu *et al.*, 2016, 2018).

Recentment, s'ha estat estudiant l'evolució clonal dels tumors de CLL on es podia observar heterogeneïtat intratumoral (Greaves and Maley, 2012; Nadeu *et al.*, 2016, 2018). Aquesta heterogeneïtat permet al tumor una progressió cel·lular i freqüents recaigudes després del tractament. El primer cop que es va observar l'heterogeneïtat intratumoral en CLL va ser gràcies a la tècnica de FISH i gràcies als SNParrays també es va poder observar

que els subclons eren genèticament diferents (Ouillette *et al.*, 2013). Gràcies als avanços bioinformàtics també es va veure que analitzant la fracció cel·lular cancerosa es podia diferenciar mutacions que procedien d'estadis més inicials (mutacions clonals) i d'altres que eren més tardanes (mutacions subclonals) (Landau *et al.*, 2013). Es va observar que la mutació de *MYD88* es donava en estadis inicials mentre que mutacions com *TP53* o *ATM* es donaven en estadis més avançats.

Afectació dels telòmers

La llargada dels telòmers també s'ha estudiat en detall en les CLL. Diferents estudis van observar que els casos amb CLL amb un escurçament del telòmers es trobaven associats amb delecions dels gens *ATM* i *TP53* permetent d'aquesta manera que les cèl·lules no entrin en senescència, es vagin erosionant els telòmers i s'escurcin. L'escurçament dels telòmers provoca la pèrdua dels caps dels cromosomes permetent la fusió de diferents cromosomes entre ells i provocant un augment de la complexitat genòmica (Poncet *et al.*, 2008; Roos *et al.*, 2008; Britt-Compton *et al.*, 2012). S'ha vist que els casos amb escurçament de telòmers acostumen a ser casos de CLL-IGHV no mutat (Damle *et al.*, 2004).

CNA i FISH

La CLL és una malaltia que no presenta translocacions recíproques, sinó que es troba més afectat per CNA. S'han detectat diferents alteracions que es troben molt freqüentment. S'ha observat que els casos de CLL presenten més delecions que guanys (1.44 vs 0.38), i que es troben equitativament distribuïts entre els CLL-IGHV no mutat i els CLL-IGHV mutat encara que el número mig d'alteracions per cas és baix, observant-se 1.8 CNA per cas (Edelmann *et al.*, 2012; Puente *et al.*, 2015).

La deleció 13q14, una deleció que afecta els microRNAs *miR15-a* i *miR16-1* i que provoca una reducció de la seva expressió, es troba present en un 35-60% dels casos. Aquesta deleció va ser detectada per primer cop l'any 1987 (Fitchett *et al.*, 1987) i es va observar que els dos microRNAs es trobaven implicats en la regulació de l'apoptosi, el cicle cel·lular (Calin *et al.*, 2005) i en la regulació de l'activitat del factor nuclear NF-kB (Garding *et al.*, 2013). A part de les delecions, també s'han detectat translocacions que provoquen el trencament del locus *miR15-a/miR16-1* (Puiggros *et al.*, 2014; Puente *et al.*, 2015). L'efecte d'aquesta malaltia es va poder observar gràcies a un model murí que se li va deleccionar aquesta regió del genoma (Lia *et al.*, 2012). Aquesta alteració és considerada una alteració primerenca i és la més freqüent de la malaltia.

La segona alteració més freqüent i la primera alteració que es va detectar en CLL mitjançant la tècnica de FISH (Gahrton *et al.*, 1980; Hurley *et al.*, 1980) va ser la trisomia 12, detectada entre un 11-16% dels pacients. La trisomia 12 es considera una alteració primerenca donat que es troba en la majoria de les cèl·lula tumorals (Döhner *et al.*, 2000; López *et al.*, 2012). Els casos de CLL amb trisomia 12 presenten una morfologia i un immunofenotip atípic, a vegades amb trisomies addicionals del cromosoma 18 i 19 i associat a mutacions de *NOTCH1* o delecioes de 14q (Matutes *et al.*, 1996; Sellmann *et al.*, 2007; Balatti *et al.*, 2012; Cosson *et al.*, 2014).

Es va trobar delecioes a 11q22-q23 (12-18%), una regió on es troben el gens *ATM* i *BIRC3*. En un 30-40% dels casos amb deleció a 11q22-q23, també es va detectar que presentaven mutacions a *ATM* (Austen *et al.*, 2007; Puente *et al.*, 2015). També es va observar que tant *ATM* com *BIRC3* es podien inactivar mitjançant mutacions o pèrdues, provocant fins i tot inactivacions bial·lèliques (Davide Rossi *et al.*, 2012; Rossi and Gaidano, 2012; Skowronska *et al.*, 2012). Es van trobar delecioes a 17p13 (5-10%) on es localitza el gen *TP53*. El 80% dels casos amb la deleció a 17p13 també es va observar que presentaven mutacions a *TP53* (Zenz *et al.*, 2008). *TP53* també es podia inactivar mitjançant mutacions o pèrdues provocant inactivacions bial·lèliques (Thorsten Zenz *et al.*, 2010; Puente *et al.*, 2015). Es va veure que tant la deleció 11q22-q23 com la deleció 17p13 s'iniciaven en subclons i s'expandien en el temps gràcies a pressions de microambient o per avantatge proliferatiu (Landau *et al.*, 2013) i que casos amb una d'aquestes dues delecioes i/o mutacions a *TP53* tenien més número d'alteracions que la resta dels casos (3 o més CNAs) (Edelmann *et al.*, 2012). S'ha observat que la deleció 11q22-q23 i la 17p13 són mítuament excloents.

Juntament amb les delecioes 17p13, 11q22.3, 13q14 i la trisomia 12, es va proposar un model pronòstic per la CLL, on les dues primeres delecioes s'associaven a una baixa supervivència i progressió cel·lular mentre que la deleció de 13q detectada com a única alteració s'associava a una millor supervivència (Döhner *et al.*, 2000).

A més d'aquestes alteracions, s'han trobat altres delecioes importants com 2q37 (2%), 3p21 (2%), 6q15 (5%), 10q24 (2%) i 15q15.1 (4%) que afecten l'expressió dels gens *S140/SP110*, *SMARCC1/SETD2*, *ZNF292*, *NFKB2* i *MGA*, respectivament (Edelmann *et al.*, 2012; Puente *et al.*, 2015). Altres alteracions que s'han trobat són delecioes a 1q23.3 (1%), 1q42.12 (1%), 6p22.1 (1%), 8p11.2-p23.3 (1,6%), 9q13-q21.11 (1%), 14q13.2 (1%) o 14q24.3 (2%), guanys en diferents cromosomes com són guanys a 2p (7%), 6p25.3 (1%) i 8q24 (5%) que provoca una desregulació de *MYC*, trisomia 18 (1%) i trisomia 19 (2%).

(Gunnarsson *et al.*, 2010; Edelmann *et al.*, 2012; Puente *et al.*, 2015) (**Figura 20**). En presència de la duplicació a 2p, es va observar que els gens *MYCN*, *RELA*, *XPO1*, i *BCL11A* augmentaven la seva expressió (Schwaenen *et al.*, 2004; Chapiro *et al.*, 2010). Es va localitzar una deleció a 18p (3%) que s'associava més a CLL-IGHV no mutat i amb un alt risc de canvis genòmics i amb trisomies de 2p i deleció a 17p13 concomitants (Edelmann *et al.*, 2012).

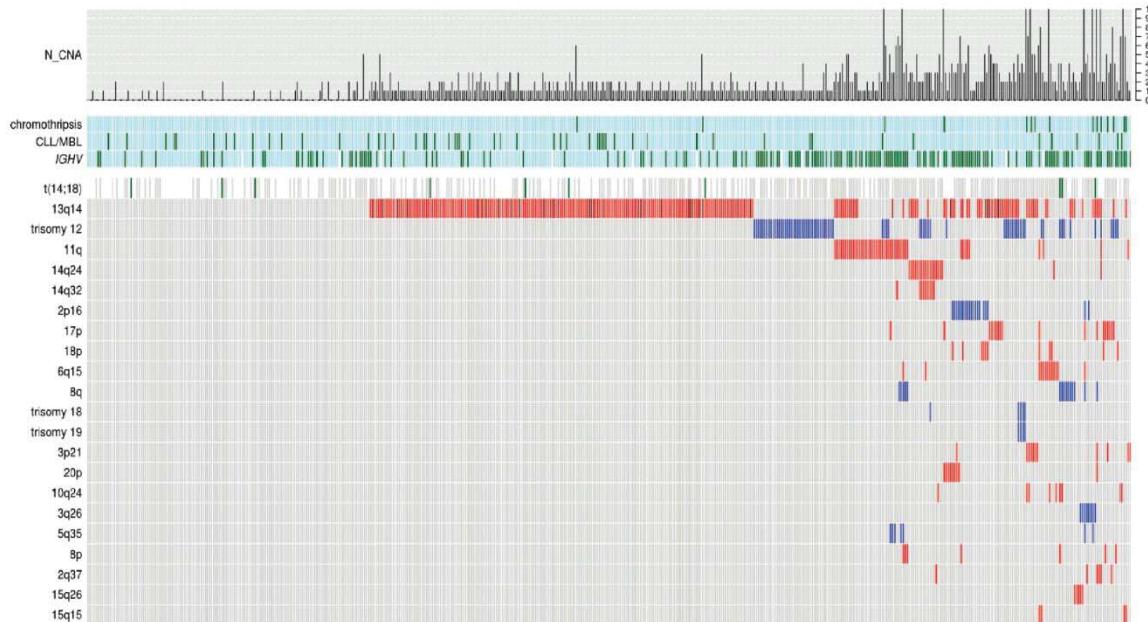


Figura 20. Distribució de CNA en CLL. Les columnes es troben els casos de CLL i cada fila denota CNA. En blau guanys, en vermell perdudes. Figura adaptada de l'article Puente *et al.* 2015.

Translocacions detectades

Mitjançant tècniques de WGS es van poder detectar les translocacions *t(14;18)(q32;q21)* (9 casos) i la *t(2;18)(p11;q21)* (1 cas) que unien el gen *BCL2* amb la IGH o la IGK, respectivament provocant una sobreexpressió del gen. Aquesta observació es va poder confirmar tant per FISH com per cariotip i PCR (Puente *et al.*, 2015). Mitjançant la tècnica de FISH també es va observar la translocació *t(14;19)(q32;q13)* en 14 casos que juxtaposava el gen *BCL3* amb la IGH, sobreexpressant el gen *BCL3* (Huh *et al.*, 2011) (**Figura 21**).

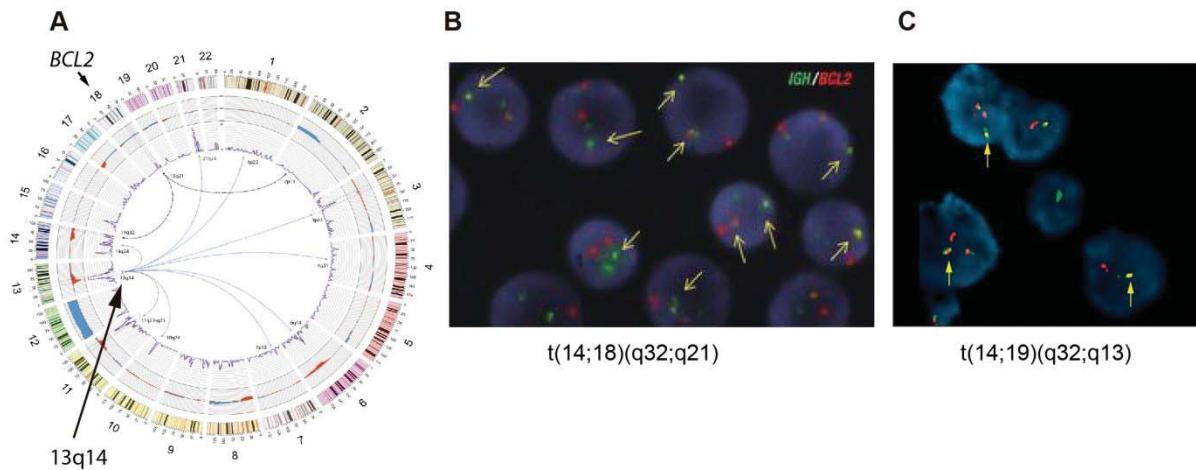


Figura 21. Translocacions recurrents en CLL. A) Translocació de 13q14 sense patró recurrent. B) Translocació t(14;18)(q32;q21). C) Translocació t(14;19)(q32;q13).

Complexitat genòmica

La majoria dels casos amb CLL acostumen a tenir poques alteracions pel que fa al número de còpies. No obstant això, es va trobar un subgrup de pacients que presentaven una complexitat genòmica i cariotípica elevada i que s'associava a pèrdues i/o mutacions als gens *TP53* i *ATM* (Kujawski *et al.*, 2008; Ouillette *et al.*, 2011; Puente *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2017). La raó d'aquesta associació és que la pèrdua de funció d'aquests dos gens, provoca un escurçament telomèric i permet d'aquesta manera diferents fusions telomèriques de diferents cromosomes, provocant una alta complexitat genòmica. En l'estudi d'Edelmann de 2012 es van detectar 7 casos de 144 que presentaven cromotripsi (10 o més canvis de dos estats de número de còpies) i 12 casos més amb una *cromotripsis-like* (7 o més canvis de CNA), 74% dels quals eren CLL-IGHV no mutat i el 79% dels casos presentaven alteracions a *TP53*, permetent d'aquesta manera que el dany genòmic pogués ser tolerat per la cèl·lula (Rausch *et al.*, 2012). El 2015, un altre estudi va detectar 15 de 452 casos amb CLL que presentaven cromotripsi o cromoplèxia i es trobaven amb més freqüència en IGHV no mutats que en mutats. En aquest estudi també van trobar associacions entre la cromotripsi i mutacions en *TP53* (Puente *et al.*, 2015). A més, l'inactivació de *SETD2* també es va trobar més freqüent en casos amb cromotripsi. En un estudi on s'analitzava un sol cas a diferents temps del diagnòstic es va observar que la cromotripsi no es donava en l'inici tumorigènic. Es va suggerir que la cromotripsi era conseqüència d'altres alteracions que provocaven inestabilitat cromosòmica associat al malfuncionament de la reparació de l'ADN (Bassaganyas *et al.*, 2013).

Canvis epigenètics

Epigenèticament, la CLL presenta una hipometilació global que es localitza principalment en el cos del gen i *enhancers* modulant la transcripció (Kulis *et al.*, 2012). Es va observar que com més canvis en metilació presentava un cas de CLL més complexitat genòmica tenia (Oakes *et al.*, 2014). També es va observar que hi havia heterogeneïtat intratumoral pel que fa a l'epigenètica quan es comparava amb cèl·lules B normals. La metilació en illes de CpG específica presentaven una metilació molt diferent i estocàstica quan es comparava a una cèl·lula B normal fet que provocava una heterogeneïtat epigenètica intratumoral (Landau *et al.*, 2014). En un altre estudi, van classificar les CLL en tres subgrups utilitzant una signatura epigenètica basada en cèl·lules B normals: casos amb una metilació similar a les cèl·lules B *naïve*, casos amb una metilació semblant a cèl·lules B de memòria i casos amb una metilació intermitja (Queirós *et al.*, 2015). Els tres subgrups presentaven diferències amb l'estat mutacional de les IGHV, tenien diferents gens mutats com *NOTCH1* i *SF3B1* i hi havia diferències amb la supervivència i temps al primer tractament.

Afectació de vies

Tot i la varietat de gens alterats en la CLL, els gens alterats s'agrupen principalment en 8 processos cel·lulars: resposta al dany de l'ADN (*TP53*, *ATM* i *POT1*), senyal de *NOTCH1* (*NOTCH1*, *FBXW7*), maduració i exportació de l'ARN (*SF3B1*, *XPO1*, i *MED12*), via de NF-kB (*BIRC3*, *NFKBIE*, *EGR2*, *TRAF3*, *NFKB2*), senyalització de cèl·lula B (*MYD88*, *IKZF3*, *TLR2*, *BCOR*, t(14;18)/*BCL2*, *KRAS/NRAS* i *PAX5*), la regulació del cicle cel·lular (*TP53* i *ATM*), apoptosis (*TP53*) i remodelació de la cromatina (*SETD2*). (Puente *et al.*, 2015) (**Figura 22**).

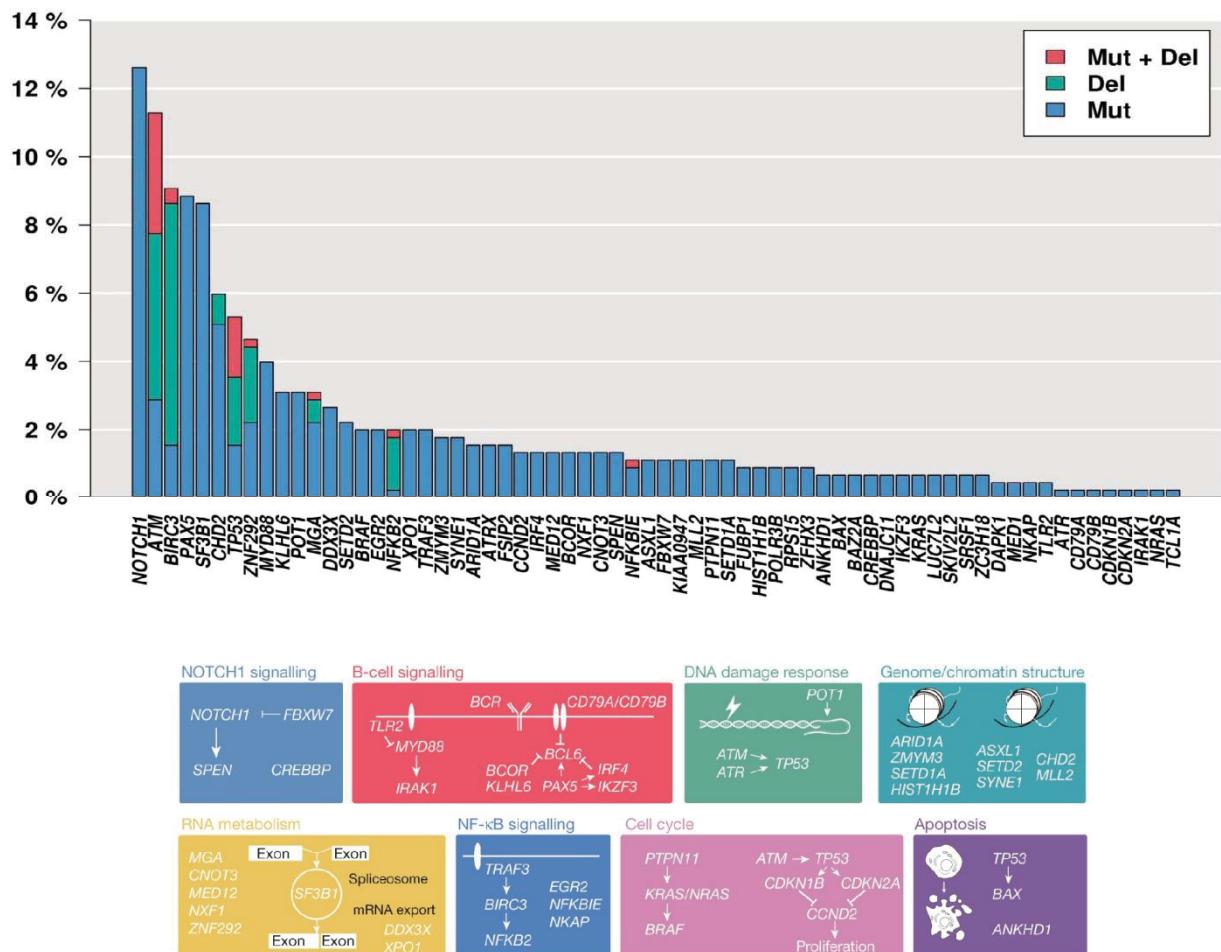


Figura 22. Freqüència dels gens recurrentment alterats i les vies afectades en CLL. Figura adaptada de l'article Puente et al. 2015.

6.3. Relació entre el pronòstic i les alteracions genètiques

El gran nombre d'alteracions diferents que presenten els casos de CLL explica l'heterogeneïtat que hi pot haver en la malaltia. Tot i així, l'efecte pronòstic d'aquestes alteracions no és el mateix en totes elles.

Mutacions somàtiques

Les mutacions a *TP53* es troben associades a una baixa supervivència i un pronòstic més desfavorable (Dicker et al., 2009; Rossi et al., 2009), però es va observar que la supervivència també era baixa quan un cas presentava *TP53* mutat només en una subpoblació molt petita del tumor (Rossi et al., 2014; Nadeu et al., 2016). Fins ara les alteracions a *TP53*, ja siguin mutacions o delecions, segueixen sent el biomarcador més informatiu per a una pitjor supervivència (Rosenquist et al., 2017).

Es van veure que les mutacions de *SF3B1* es trobaven en estadis avançats de la malaltia i que a més també tenien un efecte pronòstic. Els casos amb mutació a *SF3B1*, sense alteració a *TP53* i amb deleció d'11q23 s'associava a una supervivència i temps al primer tractament molt més curt (Wang *et al.*, 2011; Quesada *et al.*, 2012).

Les mutacions al gen *NOTCH1* també s'associen a una pitjor supervivència, s'acostuma a trobar en casos amb IGHV no mutades, els casos són resistentes al tractament de rituximab i tenen un alt risc de transformar-se en síndromes de Richter, un limfoma molt més agressiu (Puente *et al.*, 2011; Rossi *et al.*, 2012; Villamor *et al.*, 2013; Stilgenbauer *et al.*, 2014). L'associació amb mal pronòstic també s'observava en casos on la mutació de *NOTCH1* només es trobava en petits subclons (Nadeu *et al.*, 2016). A més, es va observar que tant *SF3B1* com *NOTCH1* proporcionaven un valor pronòstic independent de *TP53* (Oscier *et al.*, 2013). També es van detectar casos que presentaven *MYD88* mutat s'associaven a una millor supervivència. Els casos amb *MYD88* es troben més en CLL-IGHV mutat que en CLL-IGHV no mutat (Martínez-Trillo *et al.*, 2016). Finalment, també es van trobar associacions amb mal pronòstic en gens menys freqüentment mutats com són: *EGR2*, *MED12*, *NFKBIE*, *POT1*, *RPS15* o *SETD2* (Baliakas *et al.*, 2015; Landau *et al.*, 2015; Puente *et al.*, 2015; Parker *et al.*, 2016). Tot i les noves troballes pel que fa a nous marcadors per al prognòstic de la CLL, l'estatus de la IGHV continua sent un dels marcadors més importants. El 1999 diferents estudis van publicar que casos de CLL amb les IGHV no mutades presentaven una pitjor supervivència i una temps més curt a la progrésio, més recaigudes després de tractament i pitjor supervivència a la progressió (Damle *et al.*, 1999; Hamblin *et al.*, 1999) (**Figura 23A**).

També es va veure que si els gens *TP53*, *NOTCH1*, *NFKBIE* i *POT1* es trobaven mutats encara que fos en freqüència al·lèlica baixa, l'efecte pronòstic era el mateix que si el gen mutat tenia una freqüència al·lèlica clonal (Rossi *et al.*, 2014; Nadeu *et al.*, 2016, 2018) (**Figura 23B**).

FISH i CNA

No totes les alteracions tenen una relació amb el pronòstic de la CLL. De totes elles, la deleció 17p13, 11q22-q23 i la 13q14 són les 3 deleccions que tenen un efecte pronòstic més rellevant. Es va veure que casos tant amb deleccions a 17p13 i/o mutacions al gen *TP53* com deleccions a 11q22-q23 s'associaven a un mal pronòstic i una supervivència més baixa al pacient (Dicker *et al.*, 2009; Rossi *et al.*, 2009) mentre que quan es detectava deleccions a 13q14 sense cap altre alteració, s'associava a un pronòstic favorable al pacient amb una

supervivència més llarga (Döhner *et al.*, 2000). Es va observar que casos amb deleció a 17p i/o mutacions a *TP53* presentaven la pitjor supervivència degut a una malaltia molt avançada al diagnòstic, amb necessitat de tractament urgent i amb presència de resistència al tractament d'immunoquimioteràpia (Thorsten Zenz *et al.*, 2010). A més, casos de CLL sense alteracions i que progressaven adquirint deleccions de 17p o 11q presentaven una supervivència de progressió molt pitjor que els casos que ja presentaven les alteracions al principi o que tenien les IGHV no mutades (Byrd *et al.*, 2013). A més d'aquestes alteracions, es va observar que els guanys a 8q24 que desregulen el gen *MYC* s'associava amb mal pronòstic (Huh *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2010). Pel que fa a la trisomia 12, es va veure associació amb bon pronòstic i millor supervivència en pacients que s'havien tractat amb immunoquimioteràpia (Hallek *et al.*, 2010). Aquests casos, però, no presentaven ni deleccions ni mutacions de *TP53* (T Zenz *et al.*, 2010) (**Figura 23C**).

A partir de tots els gens alterats amb efecte pronòstic, es va proposar un algoritme pel qual les CLL es van poder classificar en 4 grups diferents: casos amb molt mal pronòstic que presentaven alteracions a *TP53* i/o *BIRC3*, casos amb un risc intermitjà amb mutacions a *NOTCH1* i/o *SF3B1* i/o deleccions d'11q, casos amb baix risc que presentaven trisomia 12 o un perfil genòmic normal i casos amb molt baix risc amb deleccions de 13q (Rossi *et al.*, 2013). El model que es va presentar en aquest estudi millorava la classificació que va proposar Döhner l'any 2000 i posteriorment es va observar que afegint l'estatus mutacional de la immunoglobulina el model classificava millor els casos (Baliakas *et al.*, 2015). A part d'aquests biomarcadors també es va observar que com més gens drivers acumulava un cas provocava una pitjor supervivència i un temps al primer tractament més curt (Puente *et al.*, 2015; Truger *et al.*, 2015).

Complexitat genòmica

També es va observar que hi havia una associació entre més quantitat de CNA i una pitjor supervivència (Yu *et al.*, 2017). Casos amb cromotripsi, juntament amb alteracions a *TP53*, es troben associats amb una pitjor supervivència i supervivència a la progressió (Edelmann *et al.*, 2012; Bassaganyas *et al.*, 2013; Puente *et al.*, 2015) (**Figura 23D**). Es va veure que la complexitat genòmica predeia una menor supervivència i que a més era independent de la presència o no de les deleccions a 17p, biomarcadors ja establerts o característiques clíiques (Ouillette *et al.*, 2011; Delgado *et al.*, 2014). La llargada telomèrica també es va trobar associada amb la progressió de la malaltia i una pitjor supervivència (Roos *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2010).

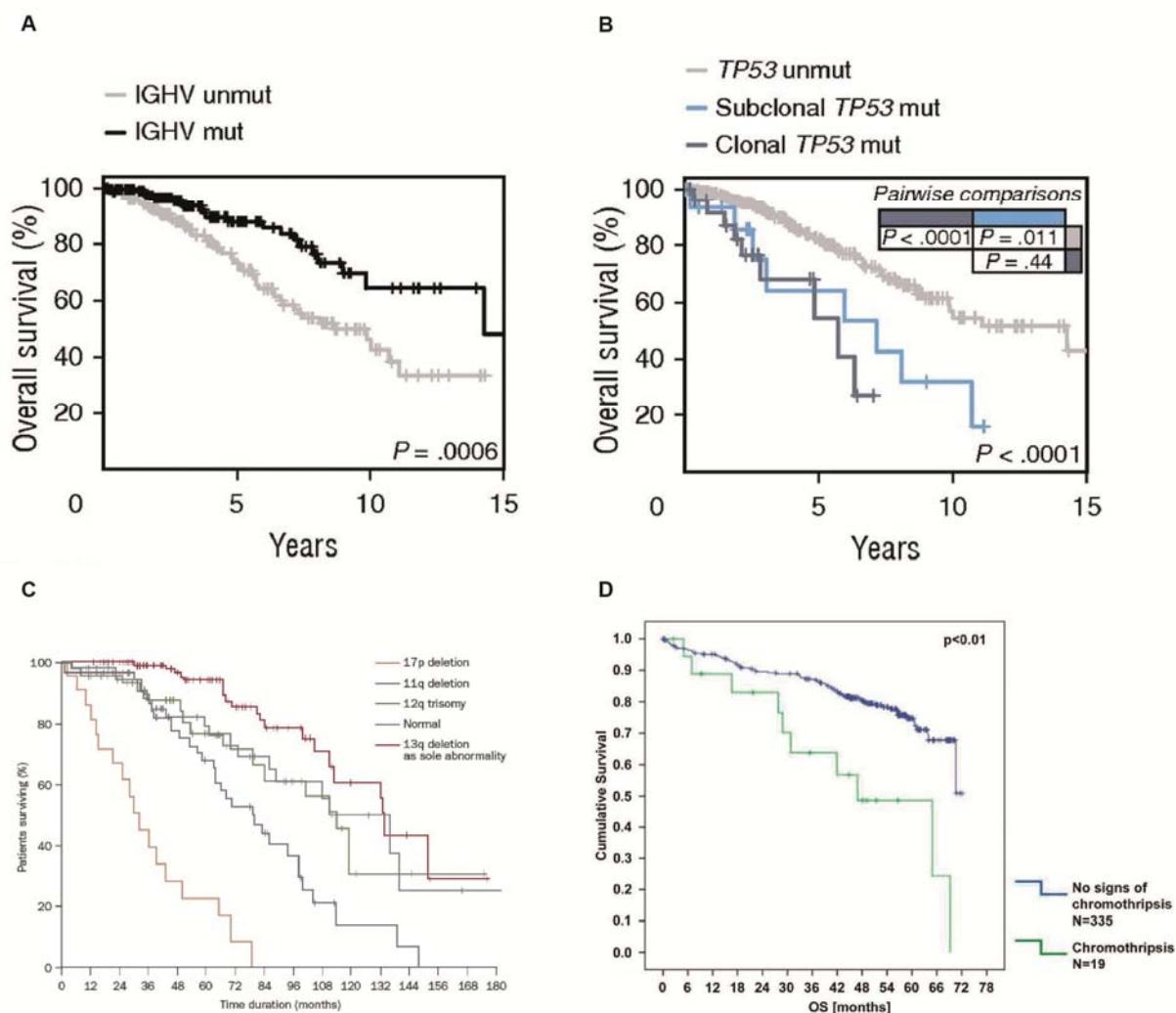


Figura 23. Gràfics de supervivència en casos de CLL. A) Comparació de la supervivència entre CLL-IGHV no mutat i mutat. B) Comparació de la supervivència entre casos CLL TP53 no mutat, mutat i mutat en freqüència subclonal. C) Comparativa de la supervivència entre casos CLL amb les alteracions estructurals del model de Döhner. D) Comparació de la supervivència entre CLL amb i sense cromotripsi. Figura adaptada dels articles Döhner et al., 2000, Edelmann et al., 2012 i Nadeu et al., 2016.

Epigenètica

Pel que fa a l'epigenètica, es va observar que casos que presentaven una metilació desordenada estocàstica en illes específiques de CpG quan es comparava amb les cèl·lules B normals, s'associava a casos amb alteracions a TP53 i un mal pronòstic (Landau et al., 2014). També es va observar que els casos amb una alta heterogeneïtat epigenètica associats a CLL-IGHV no mutat tenien més mal pronòstic que casos amb baixa heterogeneïtat de metilació associat a CLL-IGHV mutat (Oakes et al., 2014). Finalment, classificant els casos de CLL segons la seva metilació en els subgrups cèl·lules B naïve, cèl·lules B de memòria i casos amb una metilació intermitja, es va observar que el grup de

CLL relacionades amb cèl·lules B naïve s'associava a un temps al primer tractament més curt i un pitjor pronòstic que els casos de CLL amb una metilació intermitja i que els casos de CLL relacionats amb cèl·lules B de memòria s'associaven a un temps al primer tractament més llarg i millor pronòstic (Queirós *et al.*, 2015).

7. Limfoma de Cèl·lules del Mantell (MCL)

7.1. Característiques clínico-biològiques

El MCL és una neoplàsia limfoide agressiva de cèl·lules B caracteritzada per una proliferació monoclonal de cèl·lules B madures. La característica principal dels MCL és la presència de la translocació t(11;14)(q13;q32) i la sobreexpressió resultant de la ciclina D1. El MCL es troba en 0,51-0,55 casos per cada 100.000 persones i representa entre un 3 i un 10% dels limfomes no-Hodgkin a Europa. El MCL és una malaltia que afecta més freqüentment homes que dones (ratio de 2,5:1), més freqüent en caucàsics i afecta principalment a persones d'edat avançada, al voltant dels 68 anys (Campo *et al.*, 2011). El curs d'aquesta malaltia és agressiu i es considera incurable, amb una supervivència mediana d'entre 3 i 7 anys, recaigudes recurrents i necessitat de tractament urgent però malauradament sense èxit (Puente, Jares and Campo, 2018). Aquesta agressivitat està molt relacionada amb alteracions que afecten gens de la regulació del cicle cel·lular, mecanismes de resposta al dany a l'ADN o a l'activació de les vies de supervivència a cel·lular (Royo *et al.*, 2011). La presentació clínica d'aquesta malaltia és principalment de limfadenopatia, esplenomegàlia i afectació del moll de l'ós en el moment de diagnòstic amb una afectació freqüent de la sang perifèrica. Tot i així, també es pot trobar afectació de zones extranodals i freqüentment del tracte gastrointestinal i del sistema nerviós central (Ferrer *et al.*, 2008). Immunofenotípicament, el MCL expressa els marcadors de cèl·lula B CD19, CD20, CD22 i CD79a, però també expressa immunoglobulines IgM i IgD, manca de CD23 i expressió de CD5, tot i que es poden trobar alguns casos CD5 negatius (Fernandez *et al.*, 2010; Pérez-Galán, Dreyling and Wiestner, 2011). Finalment, la majoria de MCL expressen SOX11, un factor de transcripció sobreexpressat en la majoria de MCL agressius que presenten els gens de IGHV no mutats. Els MCL amb aquestes característiques i que són clínicament agressius se'ls identifica com a MCL convencionals (cMCL). Els cMCL acostumen a adquirir moltes alteracions, tant estructurals com mutacions, amb una elevada inestabilitat cromosòmica i freqüentment afectats per cromotripsi i cromoplèxia (Beà *et al.*, 2013) tot i que encara no s'han trobat punts de trencament freqüentment recurrents. El tractament més comú per aquests casos és un tractament combinat de CHOP amb bendamustina o

rituximab. Recentment, però, s'han aprovat altres tractaments per a la cura del cMCL, com ara bortezomib o ibrutinib (Campo and Rule, 2015; Dreyling *et al.*, 2017).

7.1.1. Immunoglobulines en el MCL

L'activació de les cèl·lules B es dóna en les regions fol·liculars dels ganglis limfàtics on es dóna un recombinació de canvi de classe (CSR) i una hipermutació somàtica (SHM) de les Ig per tal d'aconseguir una major variabilitat d'aquestes. L'anàlisi de l'SHM de les IGHV va permetre observar diferents subtipus de MCL podent estratificar MCL amb IGHV no mutades, poc mutades, significativament mutades o hipermutades. Es va observar que en aquests subgrups presentaven una expressió diferent de CD5, complexitat genòmica, perfil d'expressió gènica, expressió de SOX11 i presentació ganglionar diferent (Navarro *et al.*, 2012). Es va observar que els MCL amb IGHV mutats i SOX11- eren molt menys agressius que els MCL IGHV no mutats i SOX11+.

L'estat de les IGHV també va permetre classificar cada subtipus cel·lular a un estadi de diferenciació de la cèl·lula B. Els MCL amb IGHV no mutades s'originen cèl·lules B primerenques, o *naïve*; els MCL amb IGHV relativament o significativament mutades s'originen entre els estadis de cèl·lules *naïve* i de CG expressant AID o semblants a cèl·lules B de transició i, finalment, els MCL amb IGHV hipermutades s'originen en estadis cel·lulars de CG o fins i tot en estadis post-germinals. L'anàlisi del perfil d'expressió gènica també va corroborar aquest fet, observant diferències d'expressió entre casos de MCL amb IGHV mutades i no mutades on s'observava clarament signatures de cèl·lules B *naïve* en MCL amb IGHV no mutades i signatures de cèl·lules B de memòria en MCL amb IGHV mutades (Navarro *et al.*, 2012). En l'estudi de Navarro, l'any 2012 també van observar que 24% dels casos amb MCL presentaven els gens de les IGHV no mutades, un 40% dels casos amb les IGHV mínimament mutades, un 19% significativament mutades i un 17% dels casos amb les IGHV hipermutades.

7.1.2. Rol oncogènic de SOX11 en el MCL

El gen SOX11 és un gen d'especial importància pel MCL. Aquest gen és un factor de transcripció de la família SOX que conté un grup d'alta movilitat (*HMG*) i que es troba constitutivament expressat en el cMCL, incloent els CCND1-negatius, però no s'expressa en MCL leucèmic no nodal (nnMCL), en cèl·lules normals limfoides ni en neoplàsies de cèl·lules B madures, a excepció d'uns 25-50% de casos de limfoma de Burkitt (Ek *et al.*, 2008; Mozos *et al.*, 2009). En casos amb MCL, no s'ha observat cap alteració genètica al gen de SOX11

que afecti la seva expressió; ara bé, un estudi recent ha identificat un *enhancer* llunyà que interacciona tridimensionalment amb el promotor de SOX11 provocant una sobreexpressió de la proteïna (Queirós *et al.*, 2016). La sobreexpressió de SOX11 actua com a oncogen al MCL, promovent el creixement cel·lular tumoral i regulant el programa transcripcional que afecta la diferenciació de cèl·lula B, proliferació cel·lular i interaccions entre la cèl·lula tumoral i el microambient. Es va observar que el gen SOX11 es troava associat amb l'agressivitat de la malaltia. Els casos MCL SOX11-positius normalment presenten limfoadenopaties, IGHV no mutades, un cariotip complex, són agressius i requereixen tractament urgent. Per contra els casos MCL SOX11-negatius són leucèmics, esplenomegàlics, IGHV mutats i tenen poques alteracions, són estables i assíntomàtics. Es va observar que SOX11 interaccionava amb PAX5, un factor de transcripció que determina i manté la identitat de les cèl·lules B activant l'expressió dels gens específics de la cèl·lula B. El silenciament de SOX11 provocava una reducció de l'expressió de PAX5, provocant un canvi de cèl·lules B madures cap a cèl·lules plasmàtiques (Vegliante *et al.*, 2013). SOX11 també interacciona amb BCL6 un factor de transcripció necessari per al pas de la cèl·lula B pel CG, l'hipermutació somàtica de les IGHV i la diferenciació de la cèl·lula B cap a cèl·lules B de memòria o plasmàtiques. La sobreexpressió de SOX11 provoca una repressió de BCL6 quan SOX11 s'uneix a la zona d'inici de la transcripció (TSS). La repressió de BCL6 no permet l'entrada de les cèl·lules B al CG, provocant que no es mutin els gens de les IGHV i no es doni la diferenciació cel·lular cap cèl·lules de memòria o plasmàtiques (Palomero *et al.*, 2016). Fins al moment, SOX11 és un dels marcadors útils per detectar casos MCL amb disseminació ganglionar i molt agressius.

7.2. Esdeveniment oncogènic inicial: desregulació de la ciclina D1

La característica oncogènica principal dels MCL és la translocació t(11;14)(q13;q32), una reorganització estructural que juxtaposa la IGH amb CCND1 provocant una sobreexpressió del gen i una desregulació del cicle cel·lular en la transició de la fase G1/S. A excepció d'alguns casos sans on s'ha detectat la t(11;14), els limfòcits B de pacients sans no presenten la translocació i es va observar que la translocació en casos de MCL s'adquiria en estadis pre-B de la cèl·lula durant la recombinació dels segments VDJ de la IGHV dins del moll de l'ós. Tot i així, el MCL presenta altres característiques de limfòcits B madurs, fet que suggereix que la neoplàsia es desenvolupa en estadis de diferenciació més tardans (Welzel *et al.*, 2001). Aquesta translocació es troba gairebé en tots els casos amb MCL, dels quals en el 65% dels casos es pot observar la translocació per cariotip i en el 99% dels casos la translocació es pot observar mitjançant la tècnica de FISH. A més de la t(11;14)(q13;q32) també es van detectar casos amb la t(11;14)(q13;q32) amb una amplificació en el punt de la

translocació, casos amb t(11;14) complexes on els cromosomes com 2, 6, 8, 10 i 17 es trobaven translocats en reordenaments secundaris amb la translocació que afecta IGH i la CCND1 (Salaverria *et al.*, 2008). Alternativament, també es van detectar casos ocasionals on la translocació amb la CCND1 no es donava amb la IGH, sinó amb les cadenes lleugeres de la IGL o la IGK (Rocha *et al.*, 2011; Royo *et al.*, 2011) (**Figura 24**).

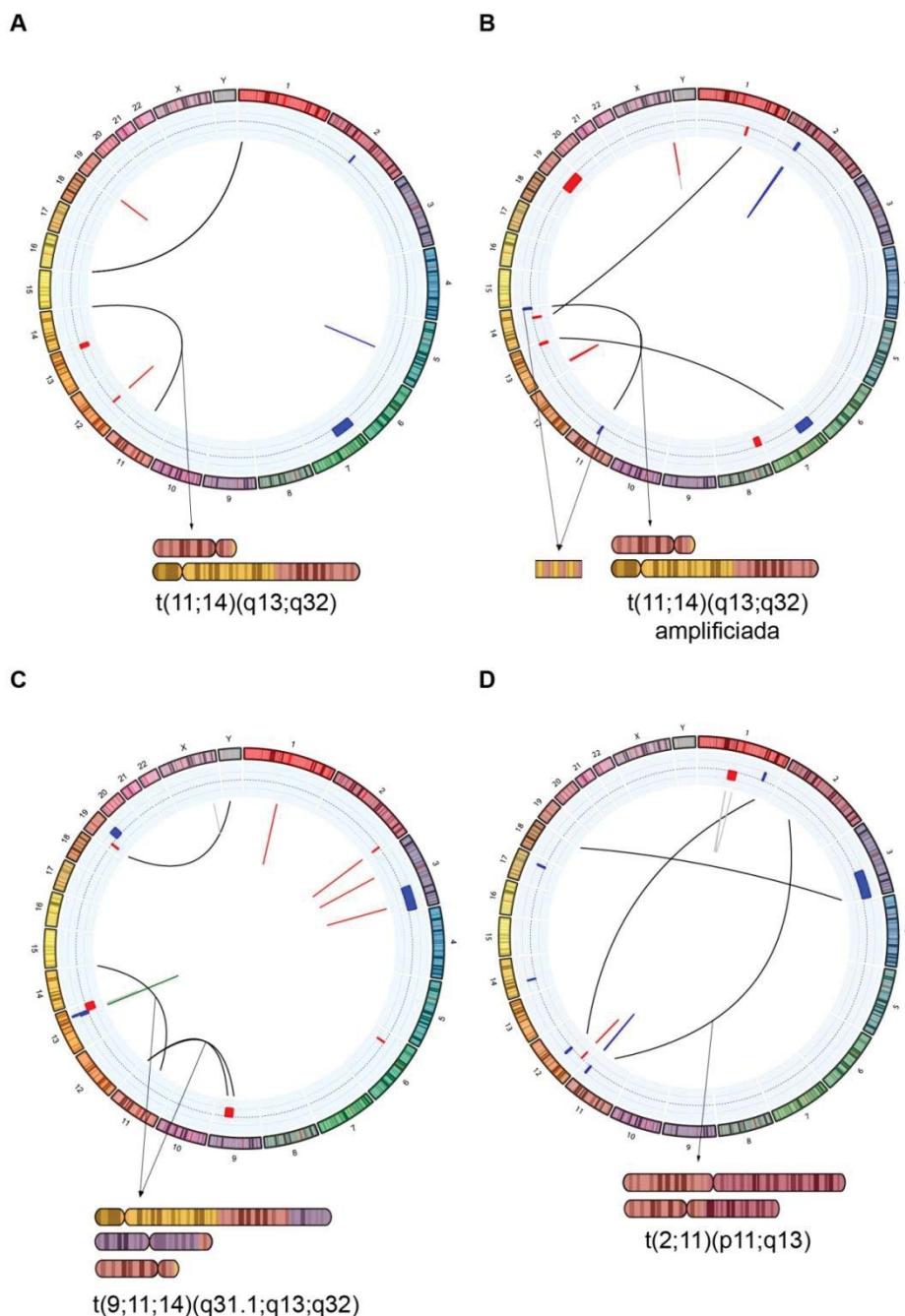


Figura 24. Representació de la translocació típica en el MCL. Dins del cercle es troben dibuixades en negre les transloacions, en blau insercions, en vermell delecions i en gris inversions. A l'exterior del cercle es troben dibuixes el CNA en vermell les delecions i en blau els guanys. A) Exemple d'un cas amb translocació t(11;14)(q13;q32). B) Exemple d'un cas amb translocació t(11;14)(q13;q32) amb regió fusionada amplificada. C) Exemple d'un cas amb translocació complexa t(9;11;14)(q31.1;q13;q32). D) Exemple d'un cas amb t(2;11)(p11;q13) involucrant IGK en en compte d'IGH.

La principal funció de la *CCND1* és la regulació del cicle cel·lular. La ciclina D1 s'uneix a les proteïnes CDK4/6 formant un complexe CDK/ciclina el qual fosforilarà *RB1* facilitant la progressió del cicle cel·lular. *RB1* té un rol molt important en la transició de la fase G1-S ja que segrestarà i inactivarà el factor de transcripció *E2F*. La fosforilació d'*RB1* provoca l'acumulació del complexe ciclina E/CDK2 que inactiva irreversiblement *RB1* i promou la progressió cap a la fase S (Harbour *et al.*, 1999; Jares, Colomer and Campo, 2007). Així doncs, la sobreexpressió de *CCND1* afecta la regulació del pas de transició G1/S i promou la limfomagènesi de les cèl·lules B normals. Però la *CCND1* no només està involucrada en el cicle cel·lular sinó que també està involucrada en la regulació de la transcripció interaccionant amb diferents factors de transcripció, en la reparació del dany a l'ADN unint-se a *RAG1*, involucrat en la recombinació homòloga, en el remodelament de la cromatina i modificant histones i finalment en l'instabilitat cromosòmica (Fu *et al.*, 2004; Casimiro *et al.*, 2012). Encara que les funcions de *CCND1* no relacionades amb el cicle cel·lular estan encara poc estudiades es va observar que la completa inactivació d'*RB1* en casos de MCL provocava una desregulació de les funcions cel·lulars on estava involucrada la proteïna *CCND1* donant la idea que la *CCND1* té un rol addicional entre funcions diferents a la del cicle cel·lular.

7.3. Formes indolents

Els estudis de diversos grups en els darrers anys ha permès observar que malgrat que els cMCL tenen una agressivitat elevada amb una necessitat de tractament urgent, també s'han observat casos de MCL amb una malaltia molt estable o indolent sense la necessitat d'administrar un tractament, seguint només un protocol d'espera i observació. A aquest subgrup de cMCL, donat que presentaven una afectació leucèmica no ganglionar i amb característiques clínico-biològiques molt diferents, se'ls va anomenar Limfoma de Cèl·lules del Mantell Leucèmic No-Nodal (nnMCL). A diferència dels cMCL, els nnMCL deriven de cèl·lules B de memòria, són genèticament estables i són SOX11-negatius (Swerdlow *et al.*, 2016). La presentació clínica dels nnMCL és leucèmica i, sovint, esplenomegàlica, però no afecta als ganglis limfàtics en estadis inicials. També presenten un baix index de proliferació, un perfil de creixement histològic focalitzat en la zona de mantell dels fol·licles i, a part de la translocació inicial t(11;14), no presenten més alteracions cromosòmiques. Els nnMCL presenten IGHV mutades suggerint el seu pas de la cèl·lula pel CG, i també presenten signatures d'expressió gènica diferents als cMCL com són una baixa o nul·la expressió dels factors de transcripció d'alta movilitat (com seria SOX11) o una baixa expressió dels gens involucrats en vies de dany a l'ADN o a l'adhesió cel·lular (Fernandez *et al.*, 2010; Del Giudice *et al.*, 2012; Royo *et al.*, 2012) (**Figura 25 i Taula 2**).

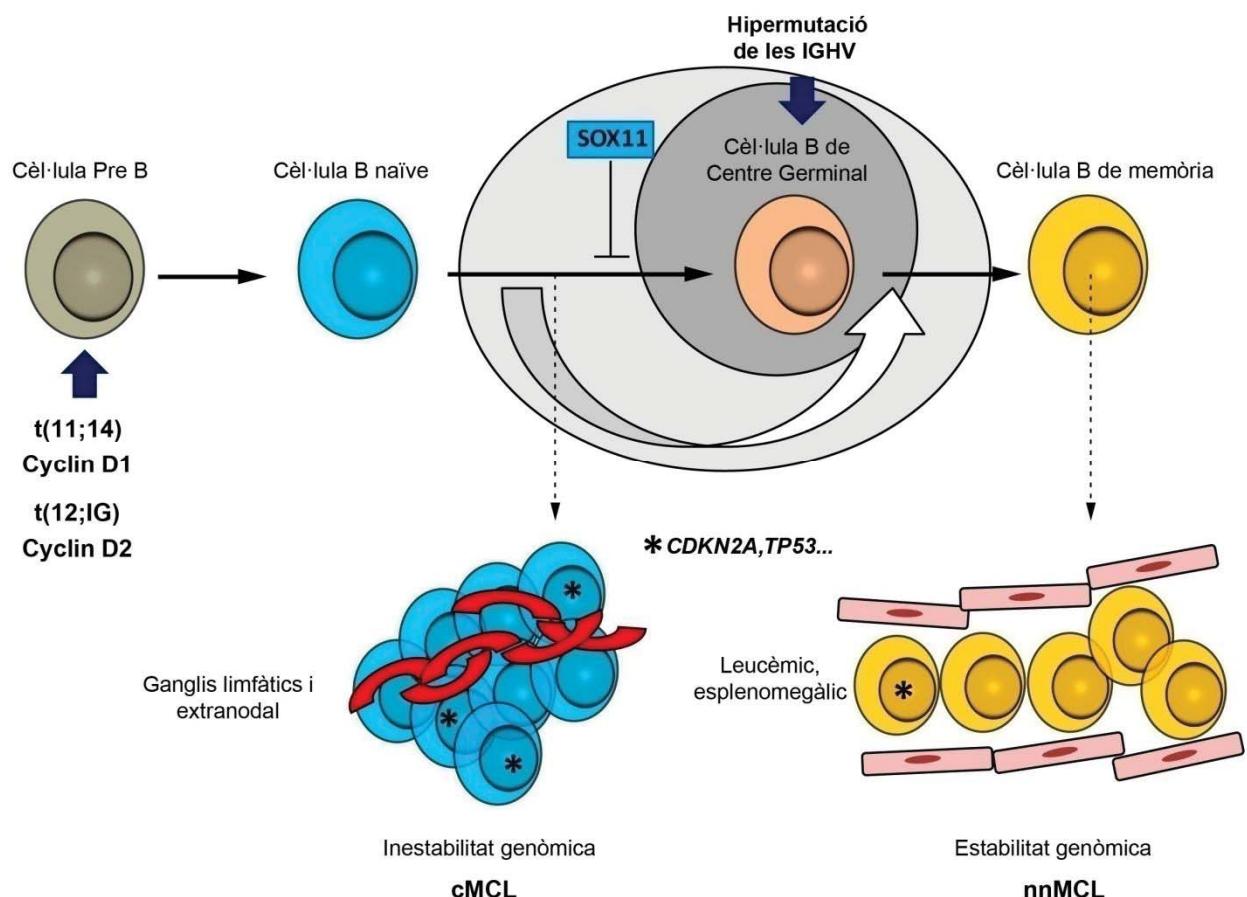


Figura 25. Representació esquemàtica dels subgrups cMCL i nnMCL. Figura adaptada de l'article Clot et al., 2018.

Alguns casos nnMCL, no obstant, adquireixen pèrdues de 17p la regió del cromosoma on es troba *TP53*, un gen supressor de tumors que en moltes neoplàsies es troba alterat. Es va observar que els casos nnMCL amb la pèrdua de 17p progressaven cap a una malaltia més agressiva (Royo et al., 2012; Clot et al., 2018).

Taula 2. Comparació morfològica i molecular entre cMCL i nnMCL (Puente, Jares and Campo, 2018).

	cMCL	nnMCL
Home/Dona	3-4	1
Presentació clínica	Limfadenopàtica, extranodal	Leucèmica, esplenomegàlica
Orígen cel·lular	Naïve-like	Memòria-like
Morfologia	Clàssica/blastoïde	Cèl·lules petites/blastoïde/diferenciació cel·lular plasmàtica (37%)
IGHV	98.7(±2.6)	95.1(±1.5)
LDH	Alta	Baixa
ECOG	Alta	Baixa
MIPI	Alta	Alt
Fenotip		
SOX11	+	-
CD5	+ (90-100%)	- (25-50%)
Inestabilitat cromosòmica	Alta	Baixa
Mutacions somàtiques, %		
ATM	55	0
TP53	25	25
CDKN2A del	20	0
CCND1	18	86
KMT2D/MLL2	18	0
NSD2/WHSC1	15	0
UBR5	14	0
BIRC3	7	7
NOTCH2	6	4
NOTCH1	4	0
TLR2	0	3
Comportament clínic	Agressiu	Estable/indolent
Tractament	Intensiu, al diagnòstic	Abstenció o tractament poc intensiu i tardà

7.4. MCL Ciclina D1-negatius

Tot i que la principal característica dels MCL és la translocació t(11;14)(q13;q32), es va observar un subgrup de cMCL que sobreexpressaven SOX11 però que no presentaven la translocació (<5%). Un estudi amb 6 casos analitzats amb la tècnica de GEP, va observar que el casos MCL Ciclina D1-negatius presentaven el mateix perfil d'expressió que els MCL Ciclina D1-positius i un perfil d'expressió diferent a altres limfomes de cèl·lula B. Però a diferència dels MCL Ciclina D1-positius, els MCL Ciclina D1-negatius no expressaven CCND1 però sí que expressaven CCND2 o CCND3 (Fu et al., 2005) (**Figura 26A**). L'any 2006 es va observar mitjançant cariotip que dos casos MCL Ciclina D1-negatius amb sobreexpressió de CCND2, presentaven una translocació que juxtaposava CCND2 al costat d'IGK (Gesk et al., 2006). En estudis posteriors i mitjançant la tècnica de FISH es va observar que el 55% dels casos de MCL Ciclina D1-negatius, presentaven reordenaments

de la *CCND2* amb les cadenes lleugeres de les immunoglobulines preferentment IGK o IGL, una alternativa a la típica translocació de la *CCND1* (Salaverria *et al.*, 2013) i que explicava la sobreexpresió observada pel grup d'en Fu l'any 2005 (**Figura 26 B-D**). Es va observar que encara que presentessin la translocació primària, els casos MCL Ciclina D1-negatiu D2-positiu presentaven un perfil de CNA molt similar (**Figura 26 E-F**).

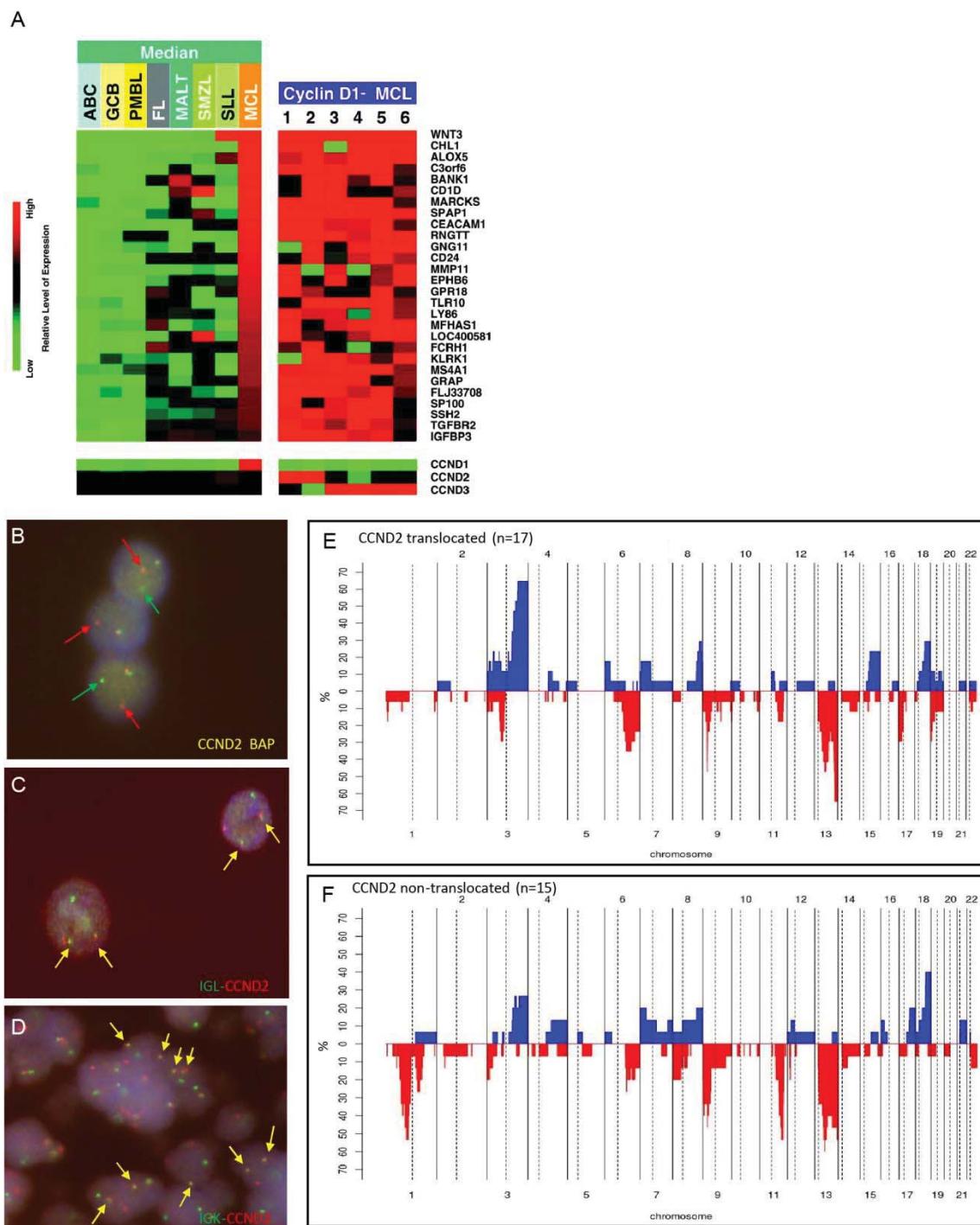


Figura 26. Comparació entre MCL Ciclina D1-positius i MCL Ciclina D1-negatius. **A)** Perfil d'expressió gènic de diferents neoplàsies limfoides, MCL i MCL Ciclina D1-negatius. **B,C,D)** FISH de MCL Ciclina D1-negatius Ciclina D2-positius amb translocació a *CCND2*. **E,F)** Perfil de CNA en casos MCL Ciclina D1-negatius amb translocació (E) o sense (F) en la *CCND2*. Figura adaptada dels articles Fu *et al.*, 2005 i Salaverria *et al.*, 2013.

Els casos MCL tant ciclina-positiu com negatiu a part de presentar el mateix perfil d'expressió, presenten una morfologia, un fenotip i alteracions secundàries similars. Malauradament, encara no s'ha trobat cap mecanisme alternatiu per explicar la sobreexpressió de *CCND2* i *CCND3* en els 45% dels casos MCL Ciclina D1-negatius restants. Els MCL Ciclina D1-negatius com els MCL Ciclina D1-positius presenten un CNA similars (Salaverria *et al.*, 2013) (**Figura 27**).

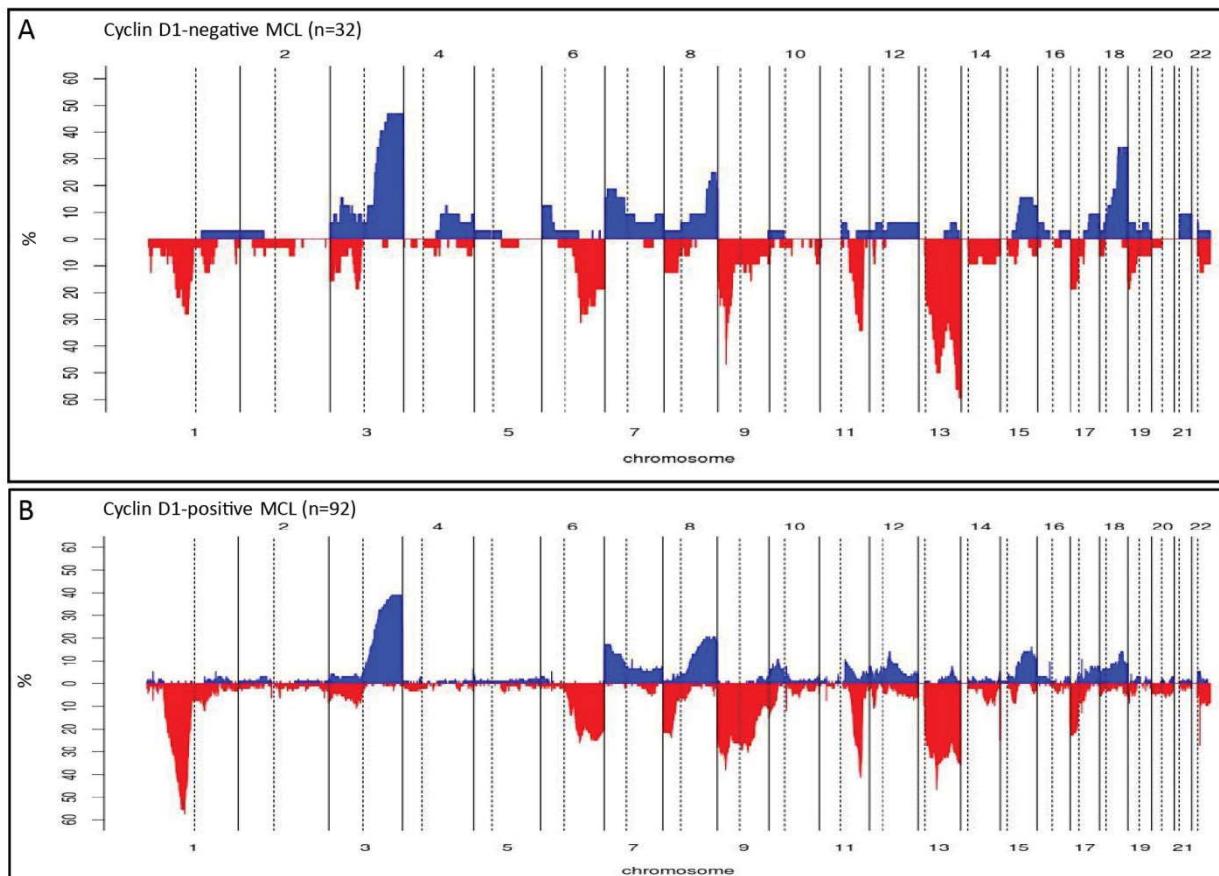


Figura 27. Perfil de CNA en casos MCL Ciclina D1-negatius (A) i MCL Ciclina D1-positius (B). Figura adaptada de l'article Salaverria *et al.* 2013.

7.5. Esdeveniments secundaris relacionats amb la patogènesis del MCL

La translocació t(11;14)(q13;q32) característica i esdeveniment inicial dels MCL és una alteració necessària però insuficient per donar lloc a cèl·lules tumorals i, per tant, es requereixen d'altres alteracions. Estudis de seqüènciació del genoma van observar que la mitjana de mutacions somàtiques per cas eren unes 3700 mutacions i que la majoria d'elles es podien classificar en les signatures mutacionals de l'edat, l'activació induïda de la citidina desaminasa (AID) i la signatura AID no canònica (Beà *et al.*, 2013). Es va observar també

que hi havia una relació directament proporcional entre el nombre d'alteracions genètiques i les alteracions epigenètiques (Queirós *et al.*, 2016).

Altres alteracions de CCND1

Un dels principals esdeveniments secundaris són els reordenaments cromosòmics i mutacions a la regió 3' UTR de la *CCND1*, que generen un augment dels nivells del ARN missatger sense la regió 3'. La pèrdua d'aquesta regió provoca la pèrdua de regions riques en elements AU i de regions d'unió de microRNAs, produint d'aquesta manera una proteïna més estable i augmentat l'agressivitat d'aquest tumor (Wiestner *et al.*, 2007). En altres estudis, també es va observar que la sobreexpressió de *CCND1* en casos de MCL es podia donar per una amplificació en la t(11;14)(q13;q32) (Beà *et al.*, 2009). També s'han identificat mutacions a la regió codificant de la *CCND1* que augmentaven l'estabilitat de la proteïna i provocaven un increment dels nivells de la proteïna (Mohanty *et al.*, 2016).

Alteracions al cicle cel·lular

A part de les alteracions secundàries que afecten *CCND1*, els cMCL també acumulen alteracions en dos vies de proliferació molt importants que regulen el cicle cel·lular: *CDKN2A/CDK4/RB1* i *CDKN2B/MDM2/TP53*. Aquests gens es troben en regions cromosòmiques on freqüentment es donen pèrdues com són 9p21 (10-36%), 13q14 (25-55%) i 17p (21-45%) on es localitzen els gens *CDKN2A/CDKN2B*; *RB1* i *TP53* respectivament, guanys a 12q13 (10%) afectant *CDK4* i *MDM2* i mutacions que afecten *RB1* (1%) i *TP53* (14-31%). També s'han observat casos amb amplificacions del gen *BMI1* (6-12%) i delecions homozigotes de *CDKN2C* (1%), dos gens inhibidors de CDKs. S'han observat casos amb delecions a 13q33-q34 (16-54%) reduint l'expressió de *CUL4A* i *ING1*, dos gens que controlen el gens *CDKN2C* i *TP53*, respectivament (Hartmann *et al.*, 2010; Royo *et al.*, 2011). Finalment, s'ha observat que un gran nombre de casos de cMCL (34%), presenten delecions mútuament excloents de les regions 9p21 i 19p13 afectant els gens *MOBKL2B* i *MOBKL2A*, respectivament i les regions 6q25 i 13q12 afectant els gens *LATS1* i *LATS2*, respectivament, tots ells involucrats en la regulació negativa de la via Hippo, una via que controla la proliferació cel·lular (**Figura 28**).

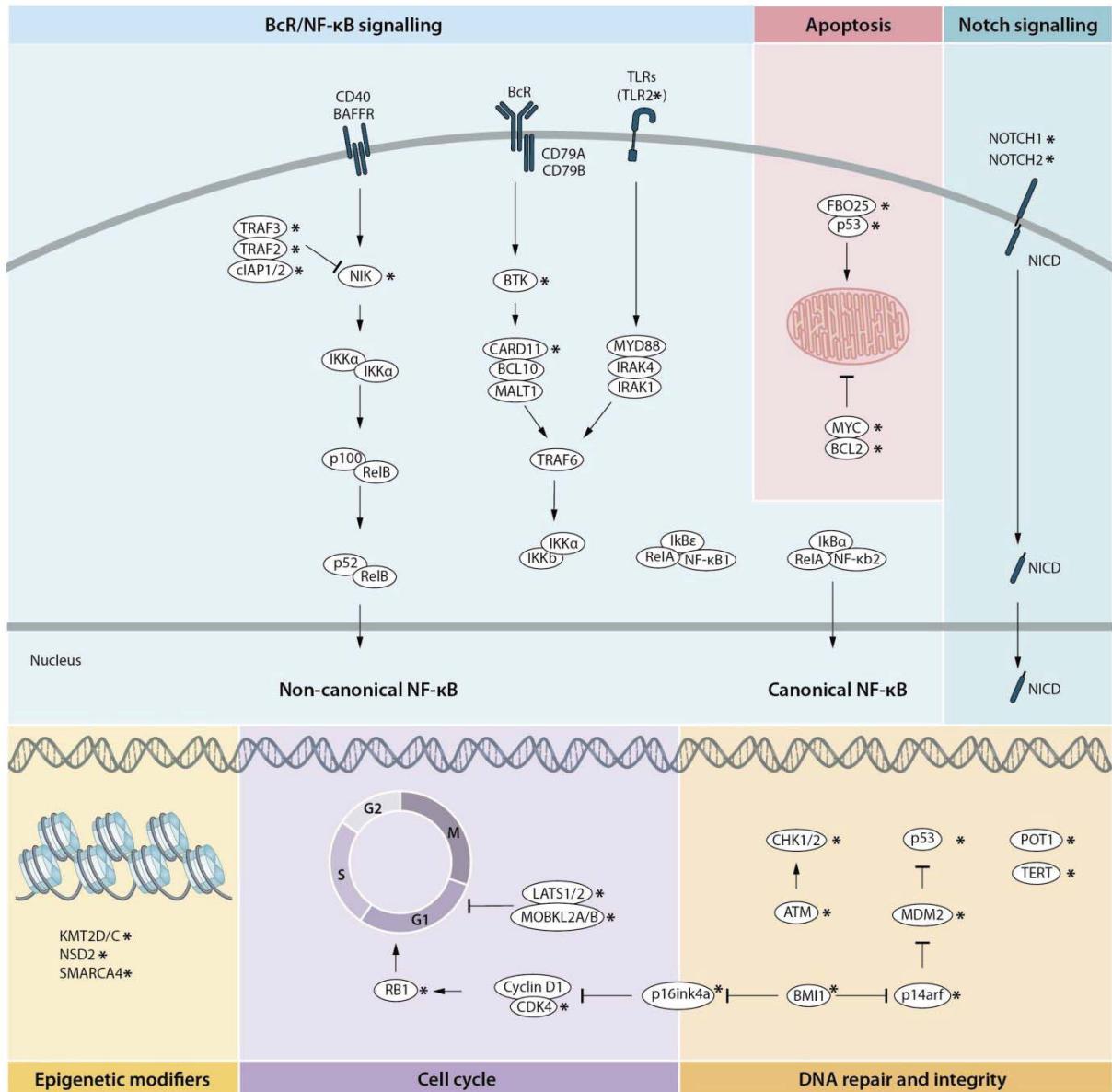


Figura 28. Vies afectades en els MCL. Figura adaptada de l'article Rosenquist, Beà 2017. * denoten els gens que es troben alterats en els MCL.

Alteracions en gens relacionats amb vies apoptòtiques

Els cMCL també presenten alteracions en altres vies diferents a la proliferació cel·lular. S'han observat amplificacions del gen *MYC* (8q24) o translocacions del gen *MYC* amb els gens de les IG, la única translocació recurrent en casos MCL a part de la t(11;14). La sobreexpressió de la proteïna *MYC*, provoca un increment de la proliferació tumoral, i disminueix l'apoptosi (Hu *et al.*, 2017). Altres alteracions en gens implicats en apoptosis són guanys i amplificacions a 18q21 (3-17%) sobreexpressant el gen *BCL2* i deleccions homozigotes a les regions 2q13 (3-17%) i 8p23 (17-34%) que disminueixen l'expressió dels

gens *BIM* i *FBXO25*, respectivament. Els grup de gens *BMI1*, *CDKN2B*, *MDMD2* i *TP53* també estan involucrats en les vies apoptòtiques i es troben freqüentment alterats en MCL.

Inestabilitat cromosòmica

El cMCL és un dels limfomes de cèl·lula B que presenta una complexitat genòmica més elevada. S'han observat 26% de casos cMCL amb cromotripsi i fins al moment un cas amb cromoplèxia, mitjançant tècniques d'SNParray i WGS, respectivament (Beà *et al.*, 2013; Moncunill *et al.*, 2014). Aquesta complexitat genòmica també es va observar en els mateixos casos utilitzant la tècnica de M-FISH (Salaverria *et al.*, 2008). Per WES es va observar que aproximadament un 50% dels casos de cMCL presentaven delecions o mutacions que afectaven el gen *ATM*, un gen supressor de tumors que quan es troba alterat, està implicat en el manteniment de l'estabilitat genòmica (Beà *et al.*, 2013). Gens com, *CDKN2B*, *MDM2*, *CHK1* i *CHK2*, que formen part de la via de *TP53*, també es troben alterats afectant la reparació de l'ADN (Jares *et al.*, 2012). També s'han observat mutacions a *POT1* (5%) i mutacions no codificant al promotor, amplificacions o reordenaments de *TERT* en 6 casos. Les alteracions en *POT1* i *TERT* promouen el manteniment dels telòmers en les cèl·lules tumorals de cMCL (Nagel *et al.*, 2010; Panero *et al.*, 2016).

Alteracions en la via de NOTCH

S'han detectat casos de cMCL amb mutacions a *NOTCH1* (5-14%) i *NOTCH2* (5%). Aquestes mutacions mútuament excloents provoquen el trencament del domini PEST fent més estables les proteïnes i activant-les (Kridel *et al.*, 2012; Beà *et al.*, 2013). La via de NOTCH és una via molt conservada que permet la senyalització entre cèl·lules adjacents. Aquesta via està involucrada en processos tals com la proliferació, la mort o la diferenciació cel·lular. Quan la via de NOTCH es desregula, però, es troba implicada en oncogenesi. Es creu que l'estabilitat de la proteïna de NOTCH1 donada per les mutacions al domini PEST provoca un malfuncionament de la proteïna i afavoreix la progressió del tumor (Kridel *et al.*, 2012).

Alteracions en les vies NF-kB/BCR

La via de senyalització de NF-kB encarregada del control de la transcripció de l'ADN, la producció de citosines i de la supervivència de la cèl·lula, també es troba afectada en casos de cMCL. S'han trobat casos amb alteracions als reguladors de la via: delecions de la regió 11q22 i mutacions alterant *BIRC3* (11-57% i 6-10% respectivament) (Beà *et al.*, 2013), mutacions en *TRAF2* (6%), delecions de la regió 6q23.3 i hipermetilacions afectant el gen *TNFAIP3* (19-37%), mutacions o delecions de la regió 6p21.1 afectant el gen *NFKBIE* (5%), delecions bial·lèliques de la regió 1p32.3 afectant el gen *FAF1*, mutacions activants al gen

CARD11 (3-15%) i finalment mutacions activants al gen *TLR2* (7%) (Beà *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2016).

Alteracions en els gens modificadors de cromatina

Els gens modificadors de la cromatina encarregats de modificar l'estructura de l'ADN, provocant un canvi en l'expressió i funció de certs gens, també s'han trobat alterats. Els gens d'histonametiltransferasa *KMT2D* i *KMT2C* i el remodelador de cromatina *SMARCA4* s'han trobat mutats en un 12-23%, 5-16% i 8% respectivament, inactivant la seva funció. També s'han detectat dos mutacions diferents en el domini SET al gen *NSD2* (també anomenat *MMSET* o *WHSC1*) en un 10% dels casos cMCL, augmentant la seva funció catalítica (Beà *et al.*, 2013). Es va observar que casos amb mutacions al gen *NSD2* presentaven un augment de l'expressió dels gens de les signatures de proliferació i cicle cel·lular. Com es va veure en casos de Mieloma Múltiple amb *NSD2* translocat amb l'*IGH*, que provoca la sobreexpressió d'*NSD2*, els casos d'MCL amb mutacions a *NSD2* incrementaven els nivells de la marca d'activació H3K36me2 i hi havia una reducció dels nivells de la marca d'inactivació H3K27me3 provocant que la cromatina estigués molt més oberta i, per tant, provocant que l'ADN sigui més accessible a agents externs nocius (Shah *et al.*, 2016). També es va observar que l'activació de *NSD2* incrementava l'activació de vies de reparació de l'ADN, fet que explica la refractoreïtat a quimioteràpia en mieloma múltiple.

Altres vies i gens alterats

Encara que no tant ben estudiades, també s'han observat mutacions en el gen *UBR5* en un 7-18% dels casos de cMCL, desregulant vies importants com el cicle cel·lular, resposta al dany de l'ADN o l'ubiquitinització de la cromatina. També s'han trobat 3-7% dels casos amb mutacions al gen *MEF2B*, un gen que es troba freqüentment mutat en casos amb Limfoma Fol·licular (FL) o amb Limfoma Difús de Cèl·lules B Grans (DLBCL). Encara que en MCL no es coneix bé la seva funció, aquestes mutacions en altres malalties redueixen l'activitat transcripcional de *MEF2B*, l'expressió de *BCL6* i la migració cel·lular (Pon *et al.*, 2015).

Les alteracions en els gens descrits però, no es troben distribuïts en la mateixa freqüència entre els subtipus cMCL i nnMCL. Els gens *ATM*, *NOTCH1*, *CDKN2A* i remodeladors de cromatina són exclusius del casos cMCL SOX11-positiu, mentre que el gen *TLR2* només es troba en casos cMCL SOX11-negatiu. Alteracions en els gens *TP53*, *CCND1*, *BIRC3* i es solen trobar en amdós subgrups (**Taula 2**).

7.6. Relació entre el pronòstic i les alteracions genètiques

La gran diversitat d'alteracions que s'ha observat en MCL corrobora l'heterogeneïtat de la malaltia i la varietat de vies diferents que poden ser afectades. Ara bé, no totes les alteracions descrites tenen un efecte en el pronòstic al pacient. S'ha vist que com més complexitat genòmica i més alteracions epigenètiques, més proliferació cel·lular i pitjor pronòstic presenta el pacient. Un dels esdeveniments que més bé diferencia els casos amb mal i bon pronòstic és la hipermutació somàtica de les immunoglobulines, on els casos cMCL sense mutacions a les IG (<97% d'identitat), i per tant, que no han passat pel CG, presenten un pitjor pronòstic envers als casos nnMCL que presenten les IG hipermutades després d'haver passat pel CG (Navarro *et al.*, 2012). SOX11 també es troba associat a una estratificació pronòstica. Els casos cMCL acostumen a sobreexpressar SOX11 i associar-se a un pitjor pronòstic mentre que els casos nnMCL no sobreexpressen SOX11 i presenten un millor pronòstic (**Figura 29A**). Les delecioens que afecten *TP53/CDKN2A* també són alteracions que s'associen a un mal pronòstic (Clot *et al.*, 2018). En especial, mutacions com delecioens que afecten a *TP53* es troben associades a un mal pronòstic i fins i tot en casos nnMCL que acostumen a tenir una bona supervivència, en adquirir alteracions a *TP53*, es transformen en limfomes més agressius amb una proliferació molt més alta i un pronòstic desfavorable (**Figura 29B**). També s'ha observat que tant les mutacions de *NOTCH1* i *NOTCH2*, tot i que poc freqüents, en casos de MCL s'associen amb molt mal pronòstic i morfologia blastoide (Beà *et al.*, 2013), i que a més l'inhibició de la via de NOTCH provoca una reducció de la proliferació i l'apoptosi de les cèl·lules tumorals (Kridel *et al.*, 2012). D'altres alteracions amb efecte pronòstic són les delecioens a 6q25, 9p21, 13q12 i 19p13 que afecten els gens de la via Hippo (*LATS1*, *MOKL2B*, *LATS2*, *MOKL2A*, respectivament) i es troben associades amb un augment de la proliferació cel·lular, complexitat genòmica i una supervivència més baixa (Hartmann *et al.*, 2010). Estudis en resistències a tractaments van observar que les mutacions en el gens *BIRC3* o *TRAF2* en casos de MCL, al ser inhibidors de la via alternativa NF-kB/BCR, provocaven resistència al tractament d'ibrutinib inhibint la via canònica d'NF-kB. Les mutacions en el gen *NSD2*, tot i que no s'han trobat associacions a una menor supervivència en MCL, s'ha observat que provoquen una proliferació més elevada i es va veure que aquests casos tenien una resposta menor a la quimioteràpia (Shah *et al.*, 2016). Pel que fa a la translocació del gen *MYC* amb IGH es va observar que els casos que adquirien aquesta translocació secundària s'associaven amb un pitjor pronòstic i una supervivència molt més curta (Hu *et al.*, 2017). Finalment també es va observar que l'acumulació de més de 5 CNA tant en nnMCL com en cMCL presentaven una pitjor supervivència que en casos que presentaven menys de 5 CNA (**Figura 29C**).

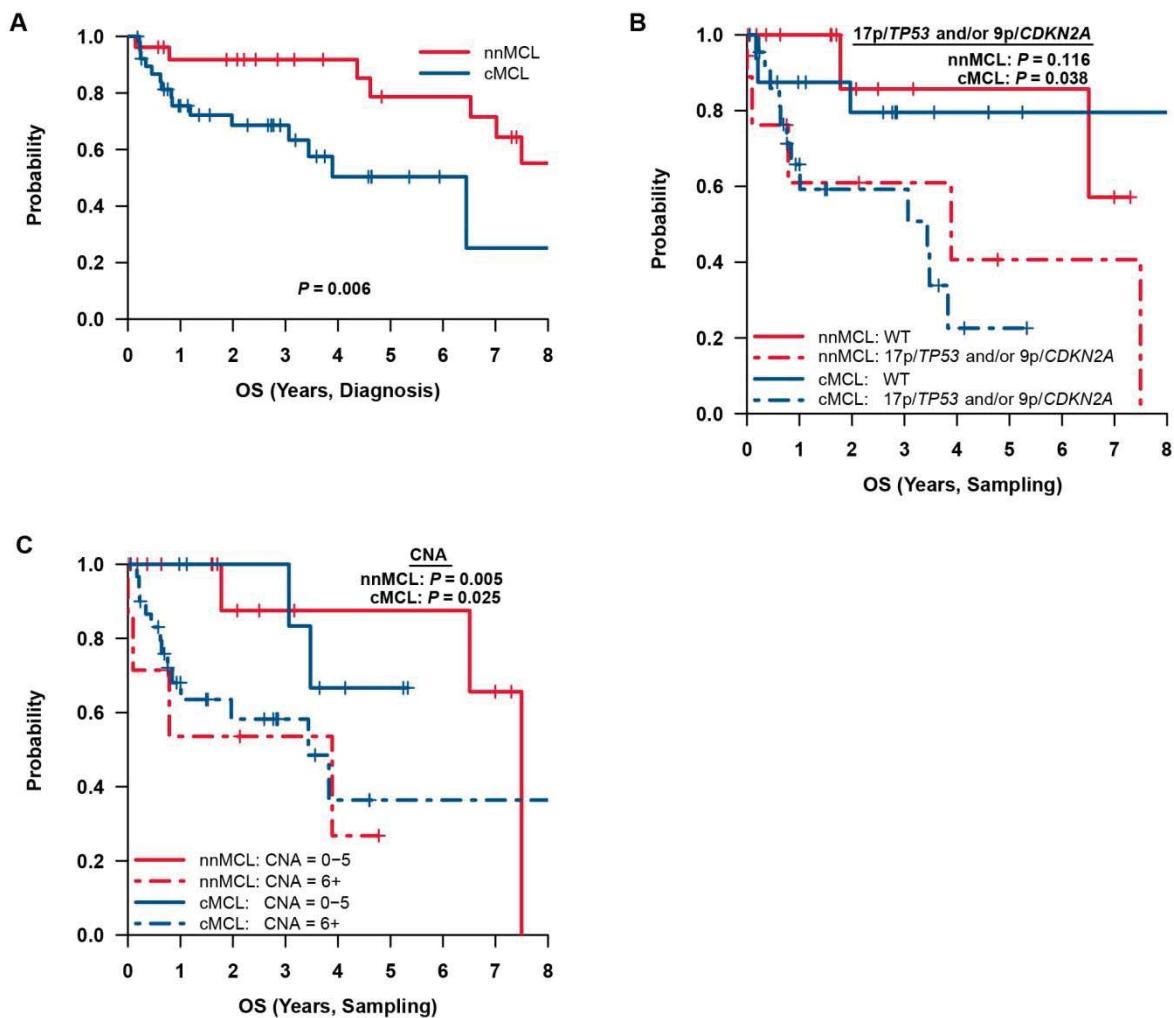


Figura 29. Gràfics de supervivència. A) Comparació de supervivència entre cMCL i nnMCL. B) Comparació de supervivència en casos amb 17p/TP53 i/o 9p/CDKN2A tant en nnMCL com en cMCL. C) Comparació de supervivència entre casos amb 6 o més CNA o a menys de 6, tant en nnMCL com en cMCL Figura de l'article Clot *et al.*, 2018.

Altres alteracions com les mutacions i deleccions que inactiven *ATM*, s'associaven amb un augment de complexitat genòmica, no obstant això, no s'ha trobat cap associació amb la supervivència del pacient (Camacho *et al.*, 2002).

Finalment, també es va observar que casos de MCL amb molta proliferació cel·lular s'associava amb mal pronòstic mentre que casos amb poca proliferació cel·lular s'associava amb bon pronòstic. La tècnica més usual per a la detecció de la proliferació cel·lular és la tinció de Ki67 mitjançant una immunohistoquímica. Tanmateix també es va descriure una signatura de proliferació basada en l'expressió de gens mitjançant microarrays d'expressió que predeia la proliferació cel·lular de cada pacient i que també s'associava amb el prònostic (Rosenwald *et al.*, 2003). Aquesta signatura de proliferació, però, requeria de material congelat per al seu ús (**Figura 30**). Es va observar també que els casos que tenien una

proliferació cel·lular més alta presentaven delecions i/o mutacions de *TP53*, delecions de *CDKN2A* i presentaven la *CCND1* amb alteracions a la regió UTR3'. Fa poc s'ha desenvolupat un mètode que també mesura la proliferació en funció de l'expressió de 17 gens. Aquesta nova signatura també s'associava amb un valor pronòstic i es podia utilitzar tant material congelat com teixit parafinat (Scott *et al.*, 2017) (**Figura 31**).

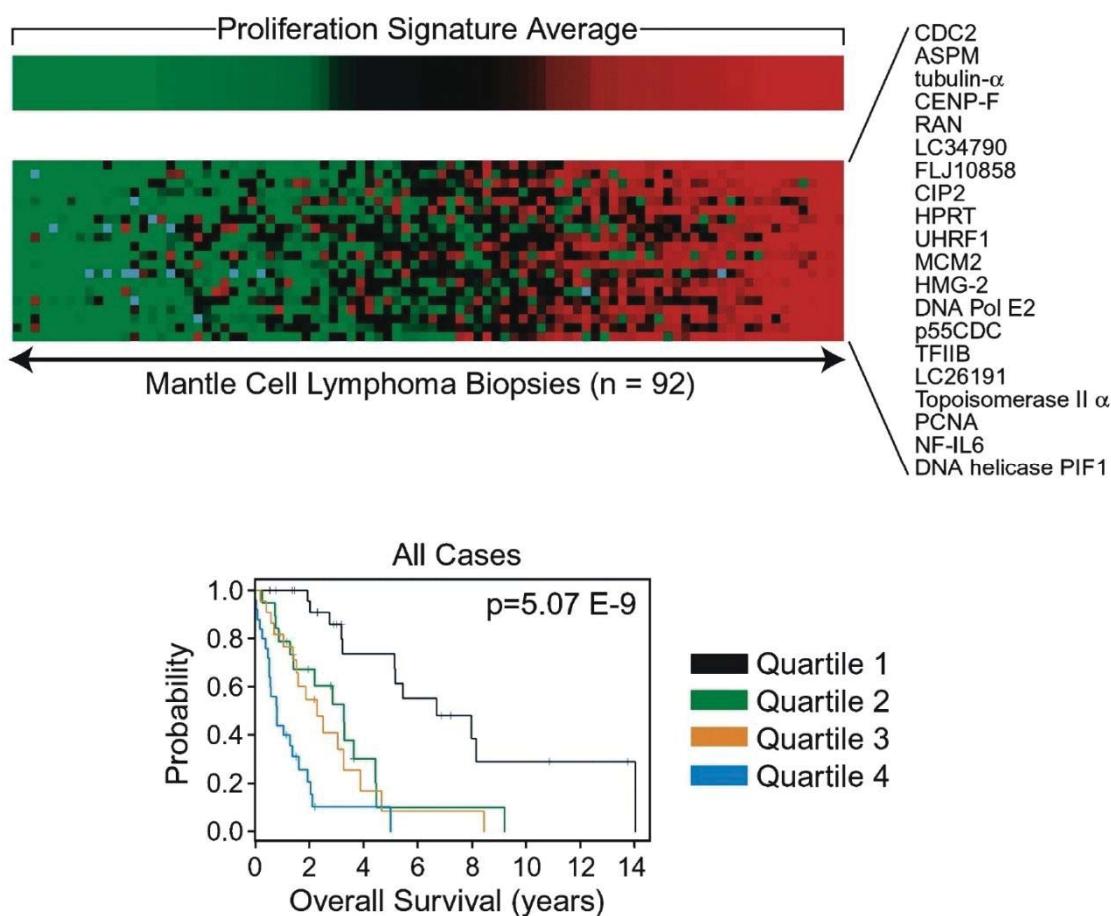


Figura 30. Signatura de proliferació i Kaplan-Meyer dels MCL publicada per Rosenwald *et al.*, 2003.

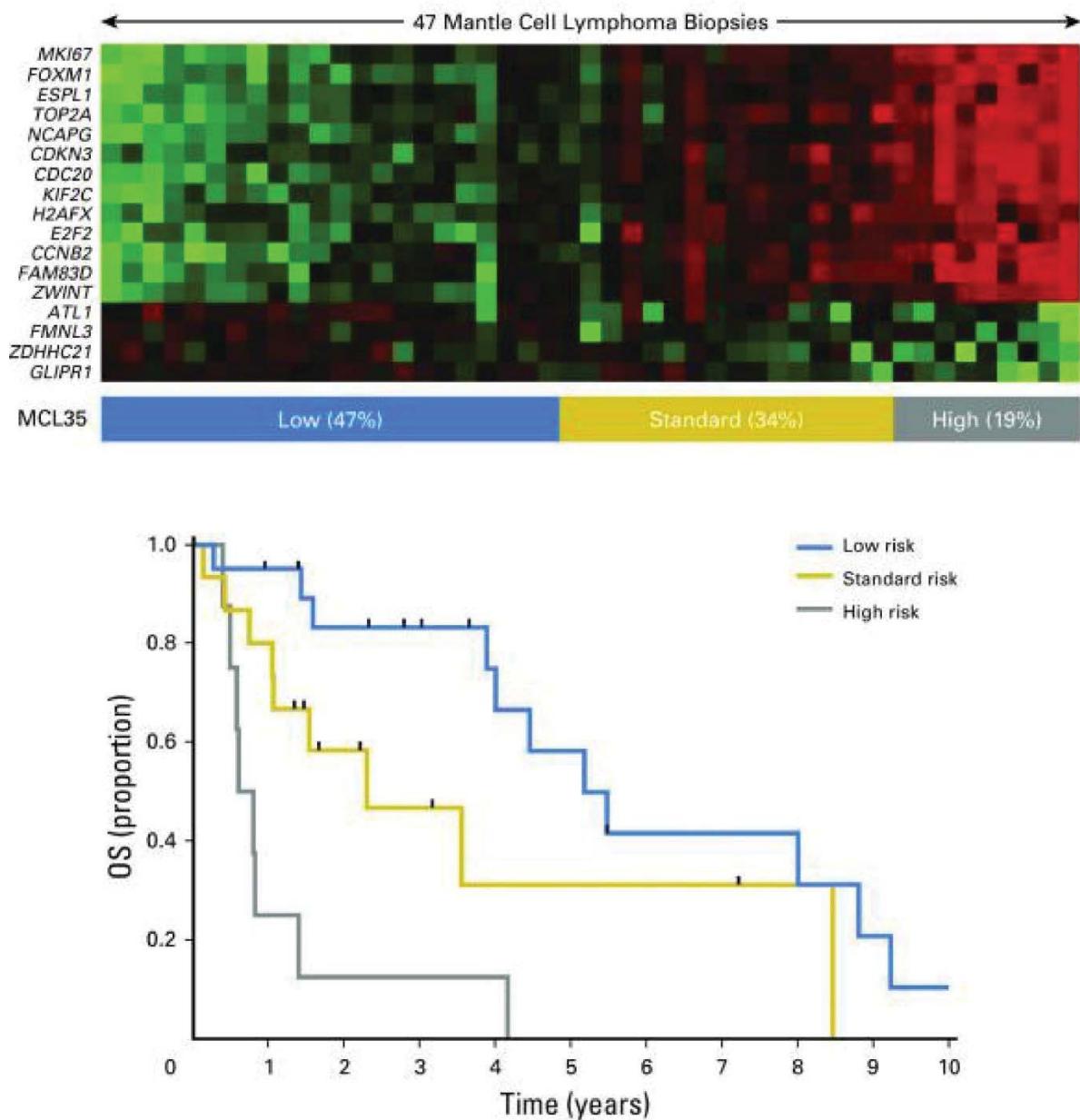
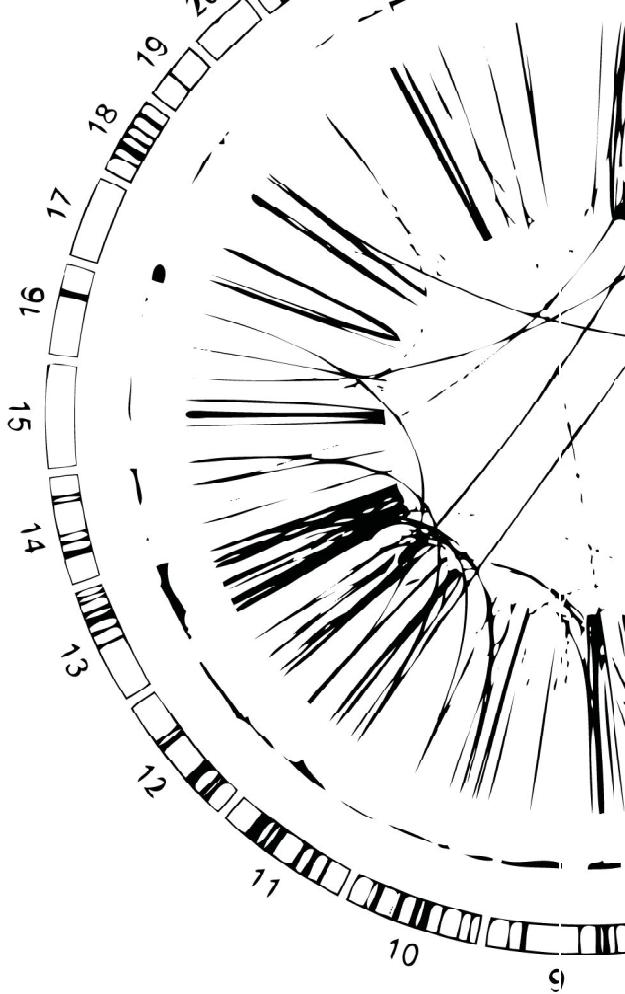
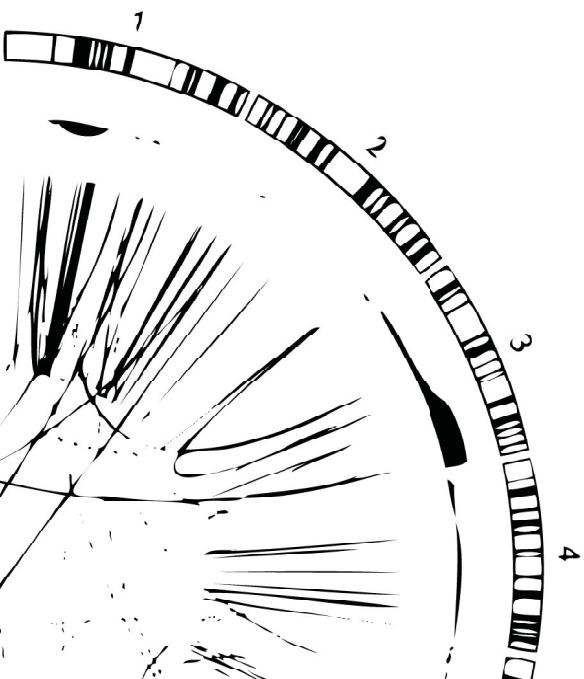


Figura 31. Signatura de proliferació i Kaplan-Meyer dels MCL publicada per Scott et al., 2017.



HIPÒTESIS I OBJECTIU



Hipòtesis

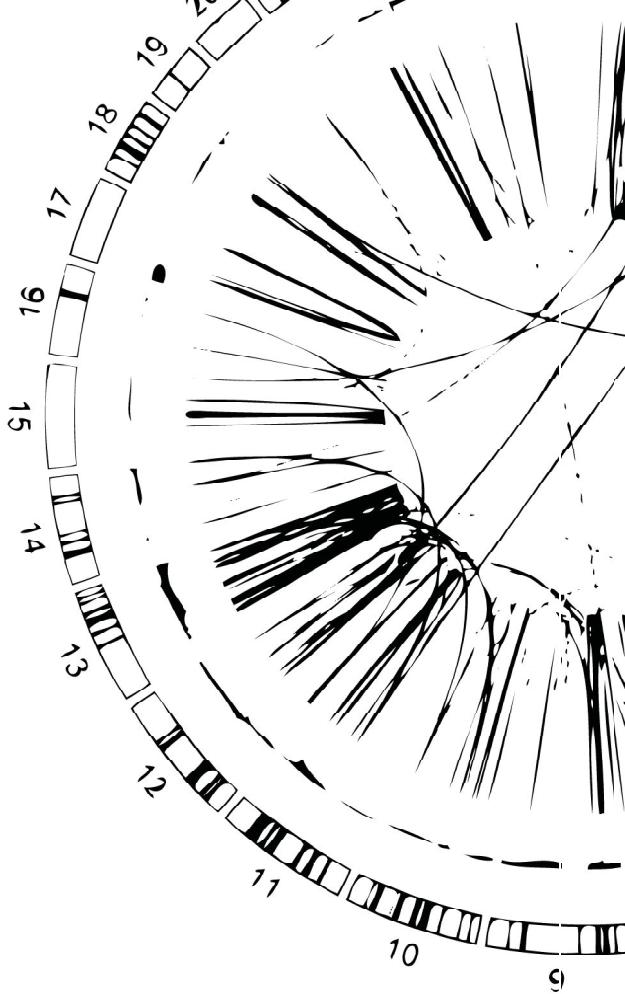
En els estudis recents de la Leucèmica Limfàtica crònica (CLL) s'han observat diferents alteracions genètiques (guanys i pèrdues) i complexitat genòmica, que exceptuant les delecions 11q, 13q, 17p i la trisomia 12 no s'utilitzen en la rutina clínica. Per tal d'utilitzar totes les alteracions genètiques i la complexitat genòmica observades, una nova plataforma genòmica és necessària en l'ús a la clínica.

El Limfoma de cèl·lules del mantell (MCL) és una neoplàsia limfoide de cèl·lula B caracteritzada per la translocació t(11;14)(q13;q32), que provoca la sobreexpressió de ciclina D1. Un subgrup de MCL no presenta la translocació i alguns expressen CCND2 com a alternativa a CCND1. El 55% dels casos MCL Ciclina D1-negatius presenten la CCND2 translocada, però el 45% restant no presenta cap reordenament. En els casos sense translocacions és necessari caracteritzar-los genèticament per tal de poder detectar possibles alteracions genètiques primàries utilitzant tècniques de nova generació (NGS) i dissenyar eines útils aplicables en la rutina clínica.

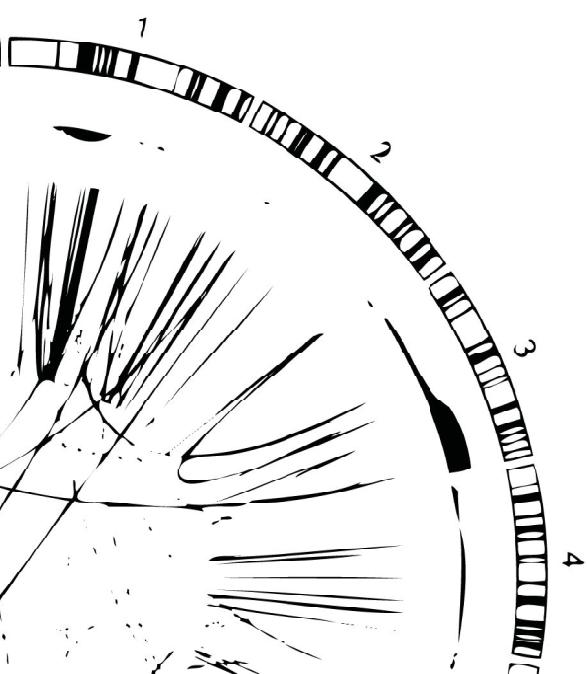
Objectius

Per tal d'abordar les hipòtesis plantejades en els dos estudis, els objectius van ser:

1. Construir una plataforma que reuneixi totes les alteracions més comuns en CLL i que amb un sol experiment es puguin analitzar totes elles.
2. Analitzar alteracions concretes de la CLL i mesurar la complexitat genòmica per tal de poder estratificar d'una manera més acurada els casos de CLL.
3. Identificar els reordenaments oncogènics primaris en els MCL Ciclina D1/Ciclina D2-negatius en els quals no se'ls hi ha trobat cap alteració primària utilitzant tècniques de FISH convencional.
4. Trobar criteris de diagnòstic útils que, juntament amb l'expressió gènica, la morfologia i el fenotip permetin classificar correctament els casos MCL Ciclina D1-negatius.



RESULTATS



Estudi 1

Detection of Chromothripsis-Like Patterns with a Custom Array Platform for Chronic Lymphocytic Leukemia

Itziar Salaverria,¹ David Martín-García,¹ Cristina López,^{1,2} Guillem Clot,¹ Manel García-Aragonés,³ Alba Navarro,¹ Julio Delgado,⁴ Tycho Baumann,⁴ Magda Pinyol,⁵ Idoia Martín-Guerrero,^{2,6} Ana Carrió,¹ Dolors Costa,¹ Ana C. Queirós,¹ Sandrine Jayne,⁷ Marta Aymerich,¹ Neus Villamor,¹ Dolors Colomer,¹ Marcos González,⁸ Armando López-Guillermo,⁴ Elías Campo,¹ Martin J. S. Dyer,⁷ Reiner Siebert,² Lluís Armengol,³ and Sílvia Beà^{1*}

¹Hematopathology Unit, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

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

³R&D, Quantitative Genomic Medicine Laboratories (qGenomics), Barcelona, Spain

⁴Department of Hematology, Hospital Clínic, IDIBAPS, Barcelona, Spain

⁵Genomics Unit, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

⁶Department of Genetics, Physical Anthropology and Animal Physiology, University of the Basque Country, Leioa, Spain

⁷Ernest and Helen Scott Haematological Research Institute, Department of Biochemistry, University of Leicester, Leicester, UK

⁸Department of Hematology, Hospital Clínico-IBSAL, Cancer Institute of Salamanca-IBMCC (USAL-CSIC), Salamanca, Spain

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a common disease with highly variable clinical course. Several recurrent chromosomal alterations are associated with prognosis and may guide risk-adapted therapy. We have developed a targeted genome-wide array to provide a robust tool for ascertaining abnormalities in CLL and to overcome limitations of the 4-marker fluorescence *in situ* hybridization (FISH). DNA from 180 CLL patients were hybridized to the qChip®Hemo array with a high density of probes covering commonly altered loci in CLL (11q22-q23, 13q14, and 17p13), nine focal regions (2p15-p16.1, 2p24.3, 2q13, 2q36.3-q37.1, 3p21.31, 8q24.21, 9p21.3, 10q24.32, and 18q21.32-q21.33) and two larger regions (6q14.1-q22.31 and 7q31.33-q33). Overall, 86% of the cases presented copy number alterations (CNA) by array. There was a high concordance of array findings with FISH (84% sensitivity, 100% specificity); all discrepancies corresponded to subclonal alterations detected only by FISH. A chromothripsis-like pattern was detected in eight cases. Three showed concomitant shattered 5p with gain of *TERT* along with isochromosome 17q. Presence of 11q loss was associated with shorter time to first treatment ($P = 0.003$), whereas 17p loss, increased genomic complexity, and chromothripsis were associated with shorter overall survival ($P < 0.001$, $P = 0.001$, and $P = 0.02$, respectively). In conclusion, we have validated a targeted array for the diagnosis of CLL that accurately detects, in a single experiment, all relevant CNAs, genomic complexity, chromothripsis, copy number neutral loss of heterozygosity, and CNAs not covered by the FISH panel. This test may be used as a practical tool to stratify CLL patients for routine diagnostics or clinical trials. © 2015 The Authors. *Genes, Chromosomes & Cancer* Published by Wiley Periodicals, Inc.

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

Supported by: Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Grant numbers: PI11/01177, PI14/00571; Worldwide Cancer Research; Grant number: 12-0142; Marató de TV3; Grant number: TV3-Cancer/2013410; Generalitat de Catalunya Suport Grups de Recerca; Grant number: 2013-SGR-378; Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC), Grant numbers: RD12/0036/0036, RD12/0036/0023, RD12/0036/0004, RD12/0036/0069; Subprograma Juan de la Cierva, Grant number: JCI-2011-10232; Miguel Servet Contract, Grant number: CP13/00159; the Spanish Ministry of Science and Innovation (MICINN) through the ISCIII—International Cancer Genome Consortium for Chronic Lymphocytic Leukemia (ICCG-CLL Genome Project); Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats” (ICREA) of the Generalitat de Catalunya; European Regional Development Fund “Una manera de fer Europa”; Alexander von Humboldt Post-doctoral Fellowship.

*Correspondence to: Sílvia Beà, PhD, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Rosselló 153, Barcelona 08036, Spain. E-mail: sbea@clinic.cat

Received 13 April 2015; Revised 4 June 2015; Accepted 4 June 2015

DOI 10.1002/gcc.22277

Published online 25 August 2015 in
Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

INTRODUCTION

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is molecularly and clinically very heterogeneous: some patients have stable disease for many years whereas others show a rapidly progressive course requiring early treatment (Swerdlow et al., 2008; Zenz et al., 2010). Although new targeted therapeutic approaches (i.e., small molecule kinase and BCL2 inhibitors) are improving the outcome, there remains no curative option besides allogeneic stem cell transplantation.

Approximately 80% of CLL cases show genetic alterations at diagnosis, mainly copy number alterations (CNA) rather than chromosomal translocations. The main recurrent CNA are losses of 13q14, 11q22-q23, and 17p13, and trisomy 12. Currently, as part of routine diagnosis, these four CNAs are tested using fluorescence in situ hybridization (FISH) and based on them, five prognostic groups can be defined (Dohner et al., 2000). Deletion in 13q14 is the most frequent CNA in CLL (~50% of cases) and is associated with good prognosis when it is found as a sole abnormality (Dohner et al., 2000). Trisomy 12 is present in 10–20% and is associated with *NOTCH1* mutations (Balatti et al., 2012; Lopez et al., 2013; Villamor et al., 2013). The 11q22-q23 losses are rarely found in early-stage disease but are present in ~25% of patients with advanced disease; the minimal deleted region harbors *ATM*, which is mutated in one-third of cases (Austen et al., 2005), and *BIRC3*, mutated in a small subset of cases (Rossi et al., 2012). The presence of 11q losses has been associated with more rapid disease progression and extensive lymphadenopathy as well as with shorter time to first treatment (TTT), duration of remission, and overall survival (Dohner et al., 1997). Nevertheless, these associations in the rituximab era are less marked (Hallek et al., 2010; Skowron-ska et al., 2012; Rosenquist et al., 2013). Finally, 17p13 deletions are found in 4–9% of CLL requiring first-line therapy; they are found in up to 30–40% patients with relapsed/refractory disease (Zenz et al., 2008, 2011), mainly due to selection of pre-existing subclones with mutated *TP53* (Rossi et al., 2014). Roughly 80% of cases with 17p deletions show *TP53* mutations (Zenz et al., 2008). 17p/*TP53* alterations are associated with worse prognosis and have important clinical implications at the time of starting the treatment given that these cases are highly chemorefractory to standard cytotoxic regimens (Dohner et al., 1995; Catovsky et al., 2007; Forconi et al., 2008; Dicker et al.,

2009; Zenz et al., 2009). Because chemotherapy depends on *TP53* it is mandatory to screen for *TP53* alterations before initiation of treatment and to consider different therapeutic approaches like alemtuzumab, idelalisib, navetoclax, or ibrutinib (Pospisilova et al., 2012; Farooqui et al., 2015).

Besides 11q and 17p losses, other CNAs reported to confer prognostic value are gains at 2p and 8q and losses at 6q and 8p (Chapiro et al., 2010; Gunnarsson et al., 2010; Brown et al., 2012). Unfortunately, routine FISH testing does not include these regions. Moreover, it has been recently reported that in a series of CLL cases with a normal FISH pattern the presence of CNAs detected by single nucleotide polymorphism (SNP) array (in 22% of cases) was prognostically relevant (Mian et al., 2013). The detection of all these genetic biomarkers may be of paramount importance in clinical practice, since they may identify high risk patients and eventually guide the treatment. Microarray studies of CLL patients have also defined a strong association of increased genomic complexity with poor prognosis (Edelmann et al., 2012; Malek, 2013), represented mainly by cases with a mutated *TP53* gene. Clonal evolution (Gunnarsson et al., 2011; Braggio et al., 2012; Knight et al., 2012; Malek, 2013) and chromothripsis (Edelmann et al., 2012) have also been associated with shorter survival in CLL. Overall, these data emphasize the advantages of assessing global genomic complexity by arrays. The only types of genetic alteration that arrays are not able to detect are balanced translocations, which are rare in CLL and have not been associated to poor clinical behavior, except if they are accompanied by a 17p loss (Baliakas et al., 2014).

Array-based platforms are now widely used in routine diagnosis, especially for constitutional diseases, and are gaining popularity in assessing cancer samples. Many studies have demonstrated that FISH and arrays have more than 90% concordance and that arrays better define gains and losses (Schwaenen et al., 2004; Pfeifer et al., 2007; Gunn et al., 2008; Sargent et al., 2009; Kay et al., 2010; O'Malley et al., 2011; Ouillette et al., 2011; Rinaldi et al., 2011; Edelmann et al., 2012; Knight et al., 2012). The few discordances observed in these studies are usually due to insufficient probe density and subclonality. Another advantage of arrays versus FISH is that only arrays are able to detect copy-number neutral loss of heterozygosity (CNN-LOH) of mutated *TP53*, for instance (Ouillette et al., 2011), and also 11q losses not targeting *ATM*, gains of chromosome 12 not involving the

TABLE I. Main Clinical Characteristics and Outcome of 180 CLL Patients

Patient characteristics	N	%
Age, years		
Median	62	
Range	33–98	
Gender		
Male	115	64
Female	65	36
Binet stage		
A	130	72
B	37	21
C	12	7
ZAP 70 expression		
Negative ($\leq 20\%$)	60	56
Positive ($> 20\%$)	48	44
CD38 expression		
Negative ($\leq 30\%$)	93	62
Positive ($> 30\%$)	58	38
IGHV mutational status		
Mutated	59	38
Unmutated	96	62
Mutations		
NOTCH1	26	22
SF3B1	13	12
TP53	18	14
Treated patients	133	74
Deceased patients	83	47
Patients treated at 10 yr (95% CI)	—	83% (71–95%)
Overall survival at 10 yr (95% CI)	—	39% (27–51%)

CI, confidence interval; yr, years.

centromere, and 13q losses not targeting *DLEU2*, which are the standard FISH probes used in CLL samples (Gunn et al., 2009; Hagenkord et al., 2010).

In the present study, we describe the development of a custom array for CLL that interrogates the most significant genetic alterations, is particularly enriched in CLL-associated regions, and that captures the complex patterns of aberrations, including chromothripsis. This tool may guide the risk-stratification and therapeutic decisions according to the genomic alterations or genomic complexity of each patient.

MATERIALS AND METHODS

Patients

The study included 133 patients from the Hospital Clinic (Barcelona) with the diagnosis of CLL according to the WHO criteria (Swerdlow et al., 2008) (Table 1). All patients gave informed consent in agreement with the Institutional Review Board and according to the International Cancer Genome Consortium guidelines (Hudson et al.,

2010). In addition, a second series of 47 CLL patients from another institution (University of Leicester, UK, with genetic analyses performed at the University of Kiel) was studied. Fifty-seven cases (32%) were sampled at the time of diagnosis and the remaining were obtained 7–696 months after diagnosis, with a median of 177 months. Overall, patients were predominantly males (64%), with a median age of 62 years, and most of them presented with Binet stage A (72%). Adverse prognostic factors were detected in about half of the patients: *IGHV* unmutated status in 62% and positive expression of CD38 and ZAP-70 in 38 and 44% of cases, respectively. At 10 years of follow-up, 83% patients (95% confidence interval [CI]: 71–95%) had received CLL-specific treatment, and the overall survival (OS) of the entire cohort was 39% (95% CI: 27–51%). Number of cases and techniques applied to each of the series are detailed in Supporting Information Figure S1.

Molecular and Cytogenetic Analyses

DNA was extracted from mononuclear blood cells from CLL patients by using a Qiagen kit (Qiagen, Valencia, CA). All cases had more than 50% tumor cells. *IGHV*, *TP53*, *NOTCH1*, and *SF3B1* mutation analyses were performed using direct Sanger sequencing as previously described (Quesada et al., 2012; Villamor et al., 2013; Delgado et al., 2014). Conventional cytogenetics (CC) was performed on G and/or R banded chromosomes obtained after short term culture (usually up to 72 h) without stimulation or with stimulation with e.g. Phorbol 12-Myristate 13-Acetate or DSP30 (Shi et al., 2013). Results were described according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature (Shaffer et al., 2013). Only cytogenetic data from samples obtained within 6 months from the DNA sampling date were considered. The FISH panel used interrogated the commonly deleted regions in 11q22, 13q14.3, and 17p13 as well as (partial) trisomy 12 (Abbott Molecular, Des Plaines, IL). For the detection of chromosomal aberrations affecting the *TERT* locus, FISH was applied using a three color break-apart assay (RP11-678B2 spectrum green, RP11-117B23 diethylaminocoumarin, and RP11-356C5 spectrum orange) (Nagel et al., 2010). At least one hundred nuclei were examined for each probe and were evaluated in accordance with the diagnostic cut-offs of the respective laboratories.

TABLE 2. Chromosomal Regions Enriched in the qChip®Hemo Array (GRCh37/hg19) for Detection of Copy Number Alterations

Chr	Start	End	Size	Region (genes)	Density ^a
chr2	60676446	60782012	105566	2p16.1 (<i>BLC11A</i>)	Very high
chr2	61104447	61151158	46711	2p16.1 (<i>REL</i>)	Very high
chr2	111878490	111926022	47533	2q13 (<i>BCL2L11</i>)	Very high
chr2	231090445	231223847	133402	2q37.1 (<i>SP140</i>)	Very high
chr8	128747629	128753930	6301	8q24.21 (<i>MYC</i>)	Very high
chr11	108082602	108252729	170127	11q22.3 (<i>ATM</i>)	Very high
chr13	50556688	50699677	142989	13q14.2 (<i>DLEU2, DLEU1, MIR16-1, MIR15A</i>)	Very high
chr17	7563917	7591659	27742	17p13.1 (<i>TP53</i>)	Very high
chr2	16050000	16150000	100000	2p24.3 (<i>MYCN</i>)	High
chr2	60500000	61500000	1000000	2p16.1-p15 (<i>BCL11A, PAPOLG, REL, PUS10, PEX13</i>)	High
chr2 ^b	111376353	111977326	600973	2q13 (<i>BUB1, ACOXL, BCL2L11</i>)	High
chr2	230055752	231666905	1611153	2q36.3-q37.1 (<i>DNER, TRIP12, FBXO36, SLC16A14, SP110, SP140, SP100</i>)	High
chr2	89118885	89438885	320000	2p11.2 (<i>IGK</i>)	High
chr3 ^b	46996537	48502973	1506436	3p21.31 (<i>SETD2, MAP4, CDC25A, FBXW12</i>)	High
chr9	21798721	22125806	327085	9p21.3 (<i>MTAP, CDKN2A, CDKN2B</i>)	High
chr10 ^b	103818600	104498019	679419	10q24.32 (<i>GBF1, NFKB2, PSD, FBXL5, SUFU</i>)	High
chr13	48007849	54010887	6003038	13q14.2-q14.3	High
chr14	106328955	106808955	480000	14q32.33 (<i>IGH</i>)	High
chr17	6500001	10700000	4199999	17p13.1	High
chr18	56250406	61070906	4820500	18q21.32-q21.33 (<i>MALT1, ZNF532, SEC11C, PIGN, TNFRSF11A, ZCCHC2, PHLPP1, BCL2</i>)	High
chr6	78000000	120000000	42000000	6q14.1-q22.31	Intermediate
chr7	124449746	136150979	11701233	7q31.33-q33	Intermediate
chr11	106000000	118000000	12000000	11q22.3-q23.3	Intermediate

^aVery high coverage: 7.7–8.4 probes × Kb; high: 0.7–1.8 probes × Kb; intermediate: 0.1–0.2 probes × Kb.^bRegions added to v3.0 and not enriched in v1.0.

Copy Number Arrays

A custom oligonucleotide-based comparative genomic hybridization (CGH) array was designed based on SurePrint G3 Human CGH 8x60K microarray using eArray software (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) (Table 2 and Supporting Information Table S1). In the version v1.0 of the array the selected oligonucleotide probes targeted some focal genomic regions at high coverage (7.7–8.4 probes per Kb), some commonly altered regions at medium/high coverage (0.4–1.8 probes per Kb), and the whole genome at a lower coverage (backbone). With this design, the backbone was composed of an average of one probe every 115 kb outside the regions of interest. The probe density was higher in 13q14.3, 11q22-q23, and 17p13 (Fig. 1A) and even more enriched in specific genes related to lymphoid neoplasms (*MTAP/CDKN2A/CDKN2B, BCL2L11, BCL11A, REL, BCL2, MALT1, MYC, NMYC*, and *SP110/SP140/SP100*); medium coverage was applied to relatively large regions spanning 6q14.1-q22.31, 7q31.33-q33, and 11q22.3-q23.3. The array was also enriched in probes covering two immunoglobulin loci (*IGH* at 14q32 and *IGK* at 2p11) for B-cell clonality control. All catalogued germline copy number variants

were removed (Database of Genomic Variants: <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>). The series of 133 patients (and one sequential sample from case 102) from Barcelona (Spain) were hybridized with the version 1.0 outsourced to qGenomics (www.qgenomics.com). Then we designed version v3.0, which included three new focal CNA (2q13, 3p21.31, and 10q24.32) and 10340 SNP probes from the Agilent catalog for LOH detection. Regions of potential CNN-LOH 6q, 8p, 11q, 13q, and 17p were interrogated with 23% (2384) of this set of SNP probes, whereas a backbone of the genome was covered with the remaining probes (7962) (Table 3). The series of 47 CLL patients from Leicester (UK) was hybridized with the v3.0 design outsourced to qGenomics.

For each hybridization 300–600 ng of DNA were used. Array hybridization and scanning procedures were performed as previously described (Salaverria et al., 2013). As quality control metric we used DLR spread (probe-to-probe log ratio noise of an array) and all samples had low values (mean 0.17; range 0.106–0.35) indicating high quality of hybridization. The qChip®Hemo array data have been deposited to GEO under the accession GSE66923.

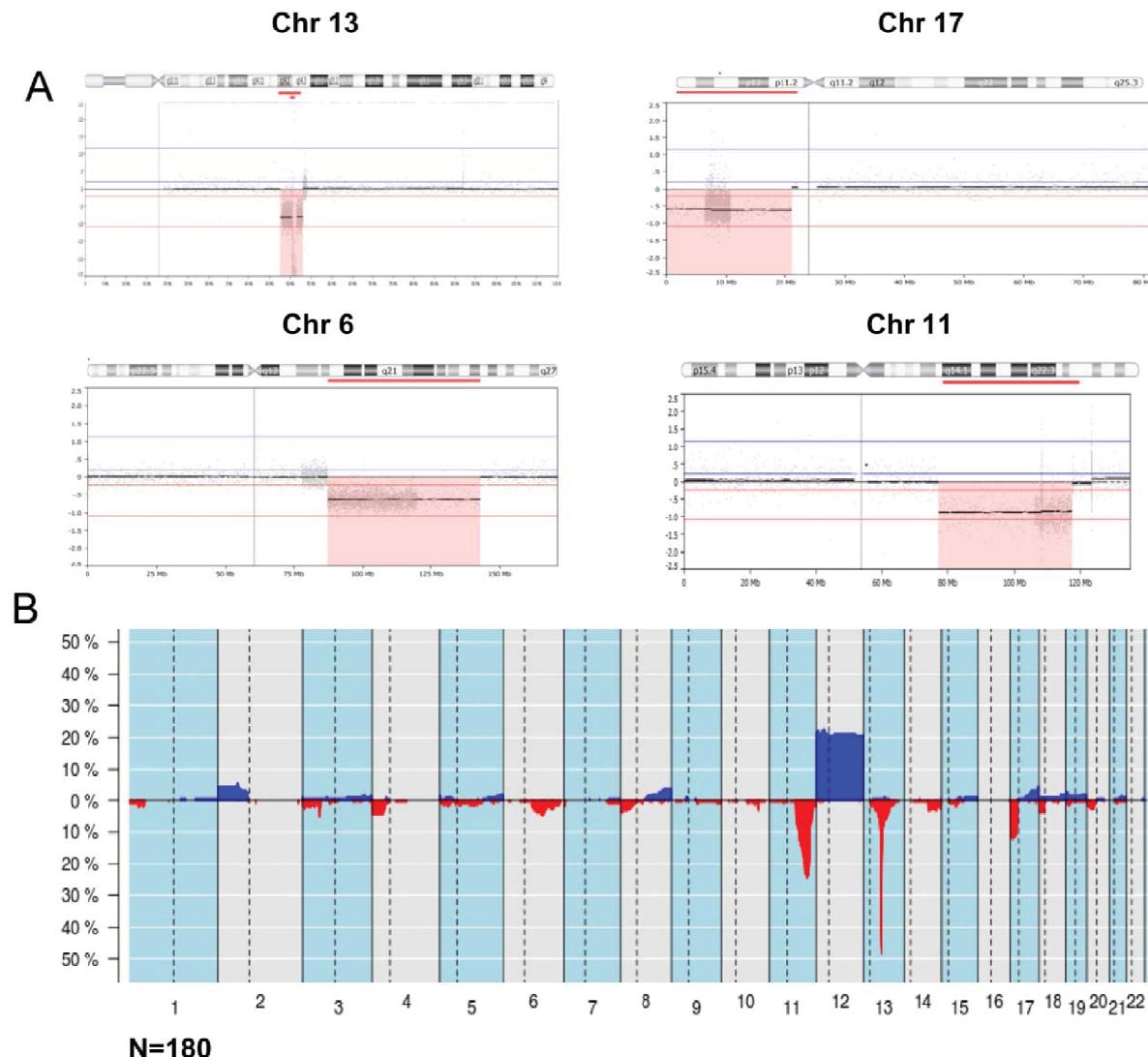


Figure 1. Whole-genome overview of copy number alterations detected by qChip®Hemo array. (A) Chromosomal view of four altered regions highlighted with a red box. Probes for losses of 13q, 17p, 6q, and 11q14-q23 are enriched in the array. Gray dots represent individual probes and the higher density of probes in these regions as

compared with the backbone coverage can be observed. (B) Frequency plot of copy number alterations in 180 CLL patients. On the X-axis the chromosomes are represented horizontally, on the Y-axis the percentage of cases showing the copy number alterations (gains in blue, losses in red).

A subset of 34 samples was additionally analyzed using Affymetrix Genome-Wide Human SNP6.0 microarrays (SNP6.0) (Affymetrix, Santa Clara, CA), outsourced to Centro Nacional de Genotipado CEGEN (www.cegen.org) following the manufacturer's procedures as previously described (Royo et al., 2012). Nexus 7.5 Discovery Edition (Biodiscovery, El Segundo, CA) was used for global analysis and visualization of results from both platforms. Array data were visually inspected for possible subclonal alterations. Coordinates are given according to the GRCh37/hg19 assembly.

Statistical Methods

To correlate data from qChip®Hemo, FISH, and karyotyping crosstab analysis (Fisher's exact test) and Cohen's kappa coefficient were used to measure the agreement between the techniques for four categorical variables (11q, 13q, and 17p losses and trisomy 12). TTT was calculated from the date of sampling to the date of frontline treatment or last follow-up, and OS was calculated from the date of sampling to the date of death or last follow-up. TTT and OS were plotted using the Kaplan–Meier method and the log-rank test

TABLE 3. Chromosomal Regions Enriched in the qChip®Hemo Array v3.0 (GRCh37/hg19) for Detection of Copy Number Neutral Loss of Heterozygosity

Chr	Start	End	Size	Region	No. SNP probes	Density (probe/Mb)
chr6	76070412	149814761	73744	6q14-q25.1	1046	14
chr8	285123	28752104	28467	8p23.3-p21.1	662	23
chr11	103864934	119876696	16012	11q22.3-q23.3	252	16
chr13	44049120	59049915	15001	13q14.11-q21.1	185	12
chr17	72082	16177386	16105	17p13.3-p11.2	238	15
Backbone	—	—	—	whole-genome	7962	3

was applied. Multivariate analysis was performed with the stepwise proportional hazards model (Cox model) assessing that the covariates used in the model did not violate the proportional hazard assumption. The 37 cases with post-treatment samples were excluded from the survival analyses. PASW Statistics 18.0 (SPSS, Hong Kong S.A.R) was used. All statistical tests were two-sided and the level of statistical significance was set at 0.05.

RESULTS

Landscape of Alterations and Complexity of CLL Genomes Detected by a qChip®Hemo Array

Of the 180 cases hybridized with qChip®Hemo, 154 (86%) had CNA. In total, 511 alterations were identified (mean 2.8 CNAs per sample; range 0–28), 377 being deletions and 134 gains (Fig. 1B and Supporting Information Table S2). Recurrent alterations usually tested in CLL were identified in 143 cases (79%): loss in 13q14.3 (48%), loss in 11q22-q23, including the *ATM* gene (24%), loss in 17p13, including the *TP53* gene (12%), and trisomy 12 (21%). Interestingly, 35 of the 43 (81%) cases with loss of 11q included also the *BIRC3* gene, and an additional case showed only deletion of *BIRC3* but no loss of *ATM* (case 184). The qChip®Hemo detected homozygous deletions of 13q14.3 in 22 (25%) of the samples with this alteration (Supporting Information Figs. S2A and S2B). Besides 13q14.3, a single homozygous deletion was found (D961, 11q23.2-q23.3, size 1.6 Mb and telomeric to the *ATM* gene) and only one case (D1016) showed amplifications (three discontinuous amplifications in 12p13.3, 12p12.3, and 12p12.1). Other recurrent CNAs were losses of 6q (7%), gains of 2p (6%), focal loss of 3p21 (5%), and 4p losses, 8p losses, and 8q gains (4% each). Among the 47 cases hybridized qChip®Hemo v3.0 (including SNP probes) only two cases showed

copy CNN-LOH of 11q, no other CNN-LOH was detected in 6q, 8p, 13q, or 17p.

From patient 102, two sequential samples were studied: at diagnosis and at clinical progression 4 years later. The case showed no CNAs at diagnosis but a complex genetic profile with 17 alterations at progression, including 17p loss (Supporting Information Fig. S3).

Of note, using qChip®Hemo array analysis we identified eight cases (8/180; 4%) with multiple lesions in single chromosomes, a pattern suggestive of chromothripsis (at least seven switches between two or more copy number states detected on an individual chromosome) (Edelmann et al., 2012; Rausch et al., 2012). Six of the cases had a deletion in 17p, with concomitant mutation of *TP53* in three of these. Interestingly, in three of the eight cases with the chromothripsis-like pattern we observed a shattered 5p arm characterized by alternating losses and gains, including gain of the *TERT* (Figs. 2A and 2B). To confirm the alterations at the *TERT* locus we performed FISH with a three color break-apart assay (Nagel et al., 2010). Consistent with the array results, one case had a gain of the *TERT* locus in 30% of the nuclei analyzed (D1016). The other two cases (D1089 and 094) showed gain of the *TERT* locus in 86% and 62% of the nuclei, respectively, and loss of the centromeric region with breakpoints closely centromeric of *TERT*. Interestingly, gain of *TERT* in case 094 showed a tandem duplication pattern (Fig. 2C). Two cases without 5p alterations showed a normal FISH pattern, i.e. two normal copies of the gene (D961 and D990).

Comparison of the Custom Array with FISH, Metaphase Cytogenetics, and SNP6.0 Array

We next compared alterations detected by qChip®Hemo array and FISH in 106 cases. The median percentage and range of altered cells by

Figure 2

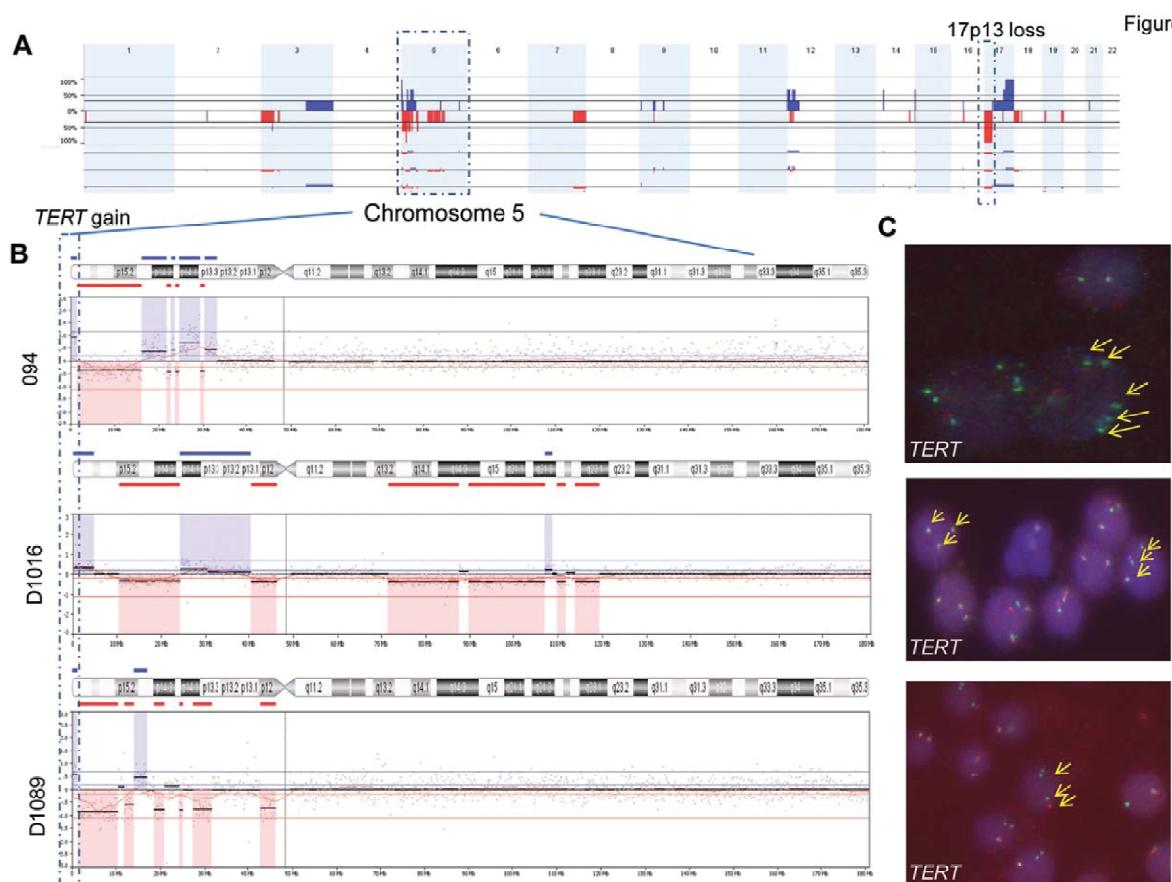


Figure 2. Chromothripsis of chromosome 5 detected by qChip®Hemo array and *TERT* analysis. (A) An overview of whole-genome alterations of 3 CLL patients with chromothripsis is shown in the upper panel. Chromosomes 1 to 22 are represented horizontally (gains in blue, losses in red). (B) Chromosome 5 of the three affected patients; 5p was involved by chromothripsis in all cases and extended to 5q in one patient. The *TERT* gene, included in the minimally gained region, is highlighted by a square. All cases showed concomitantly gain

of 17q and loss of 17p (with mutation of *TP53* only in case D1016). (C) Interphase FISH analysis confirmed gain of *TERT* in the three cases with gain. FISH results of case D1016 showed three signals for RP11-678B2 (green), RP11-117B23 (blue), and RP11-356C5 (orange); FISH results of case D1089 and 094 showed three signals for RP11-678B2 (green) and RP11-117B23 (blue) and one signal for RP11-356C5 (orange), and case 094 showed an amplification or tandem duplication pattern. Arrows indicate *TERT* signals.

FISH was 81% (range 20–99) for 11q loss, 62% (range 20–90) for trisomy 12, 62% (range 10–100) for 13q loss, and 30% (range 10–100) for 17p (Supporting Information Tables S3 and S4). Concordance measured by kappa coefficient showed perfect agreement for loss of 11q and trisomy 12 ($\kappa = 1.00$), strong for 13q loss ($\kappa = 0.806$), and moderate for 17p loss ($\kappa = 0.598$). Overall, there was a high specificity (100% for all regions tested) and sensitivity (mean: 84%; 100% for 11q loss and trisomy 12, 84% for 13q loss, and 50% for 17p loss). All discrepancies corresponded to subclonal alterations detected only by FISH in 10–22% of the cells in 10 cases with 13q14 FISH deletion and 10–17% of the cells in 13 cases with 17p FISH deletion. Among the 26 cases without CNAs by array, four cases had only deletion of 13q14 by

FISH in 12, 12, 14, and 22% of the cells, respectively.

Comparison between the qChip®Hemo array and CC results was performed using only data from the 64 cases with abnormal karyotypes (Supporting Information Tables S3 and S5 and Fig. S4). The concordance was strong for 11q loss and trisomy 12 ($\kappa = 0.806$ and 0.779) and good for 17p loss ($\kappa = 0.706$). Thirteen of the 15 (87%) discrepancies were CNAs detected by array but not by CC (five deletions of 11q, 5 trisomies 12, and 3 deletions of 17p). In two cases, the 17p deletions were not detected by array. Deletion in 13q was observed in 18 cases by CC, 14 of them were also detected by array but four subclonal deletions were only detected by CC (in 2, 3, 4, and 6 metaphases, respectively).

The combination of CC and the qChip®Hemo array information identified that common losses in 13q and 17p were associated with recurrent translocations involving these regions: nine translocations involving 13q with chromosomes 3, 7, 9, 11, 14, 16, and 17 as partners had loss of the minimal region in 13q14.3 in all cases except two. Similarly, nine translocations involving chromosome 17 with chromosomes 4, 5, 13, 15, and 18 as partners resulted in *TP53* loss in all cases except two. Interestingly, 3 cases had translocations involving 3p, and one of them (case D1024) had a focal loss of 2.7 Mb, including the *SETD2* and *MAP4* genes, due to an unbalanced translocation with 13q14, $\tau(3;13)(p22;q14)$. Interestingly, a *MALT1-MAP4* fusion has been reported in diffuse large B-cell lymphoma (Murga Penas et al., 2006). No translocations of 11q were found, although it was the second most frequently lost region. Three cases harbored the $\tau(14;18)(q32;q21)$ but no losses were observed in the 18q region.

The results of the qChip®Hemo array were next compared with the SNP6.0 array results in 34 cases. Both platforms reliably detected the same CNAs (Supporting Information Fig. S5), and only two minor discrepancies were observed: a biallelic loss in 13q14.3 that was detected as a monoallelic loss by SNP6.0 (Supporting Information Fig. S2C) and a small and subclonal loss in 13q14.2 (35 Kb) in case 038 detected only by qChip®Hemo (due to a high coverage of the region in the targeted array: 326 probes in qChip®Hemo and 12 probes in SNP6.0).

Gene Mutations

High risk mutations in *NOTCH1*, *SF3B1*, and *TP53* were detected in 22, 12, and 14% of the patients, respectively. In relation of common CNAs, trisomy 12 was more common in cases with *NOTCH1* mutations than in cases with *NOTCH1* wild-type ($P = 0.01$); 13q14 losses were more frequent in cases with wild-type *NOTCH1* compared with those with *NOTCH1* mutations ($P = 0.015$); and 17p loss was associated with *TP53* mutations ($P < 0.001$) (Supporting Information Fig. S6). Of the 26 cases without CNAs by array eight had mutations in *NOTCH1* and four had *SF3B1* mutations; none had *TP53* mutations.

Clinical Impact

We next investigated whether the presence of CNA detected by qChip®Hemo array had a sig-

nificant impact on patient outcome. CLL patients with 11q losses had significantly shorter TTTT ($P = 0.003$; hazard ratio [HR] 2.4; 95% confidence interval [CI] 1.3–4.3); patients with two or more CNAs also had shorter TTTT ($P = 0.001$; HR 2.6; 95% CI 1.5–4.4) (Supporting Information Fig. S7). Moreover, outcome analysis showed that patients with 17p deletions detected by array analysis had a significantly shorter survival than patients without 17p loss (5-year OS, 19% versus 60%, $P < 0.001$). However, patients with 17p loss detected only by FISH in low percentage of cells (<17%) behaved similarly to patients without 17p loss (Figs. 3A and 3B). Additionally, patients with chromothripsis-like patterns had poor prognosis compared with patients without such a pattern (5-year OS 0% versus 56%; $P = 0.02$) (Fig. 3C). Finally, stratification of patients according to number of CNAs showed that chromosomal complexity correlated with prognosis (>6 CNAs vs. 4–6 CNAs vs. 0–3 CNAs; 5-year OS 19, 45, and 61%, respectively; $P = 0.001$) (Fig. 3D). In a multivariate analyses assessing OS (including 17p13 deletions, presence of chromothripsis, and genomic complexity [>6 CNAs]), only deletions of 17p13 (HR 3.5; 95% CI: 1.7–7.2; $P = 0.001$) showed independent prognostic impact. CNA in CLL patients analyzed by qChip®Hemo array could recapitulate the genetic model of CLL originally developed by Dohner et al., 2000 based on FISH results ($P < 0.001$) with increasing survival times according to five genetic categories (17p loss, 11q loss, trisomy 12, no alterations, and 13q loss) (Supporting Information Fig. S8).

DISCUSSION

During the last decade, FISH has represented a powerful tool to assess the main four genomic alterations in CLL and has also been a very useful technique to predict the patient's outcome (Dohner et al., 2000). More recently, it has been used to guide therapy in a subset of patients (Hallek et al., 2008). Karyotype analysis can identify translocations and high genomic complexity in addition to common chromosomal losses, but has the limitation of the low mitotic rate of the CLL cells in culture. Several recent reports have shown that low and high resolution arrays are able to detect characteristic CLL alterations and to provide additional prognostic information compared with standard FISH using four markers (deletion of 11q, 13q, and 17p, and trisomy 12) (Chapiro et al., 2010; Gunnarsson et al., 2010, 2011; Edelmann

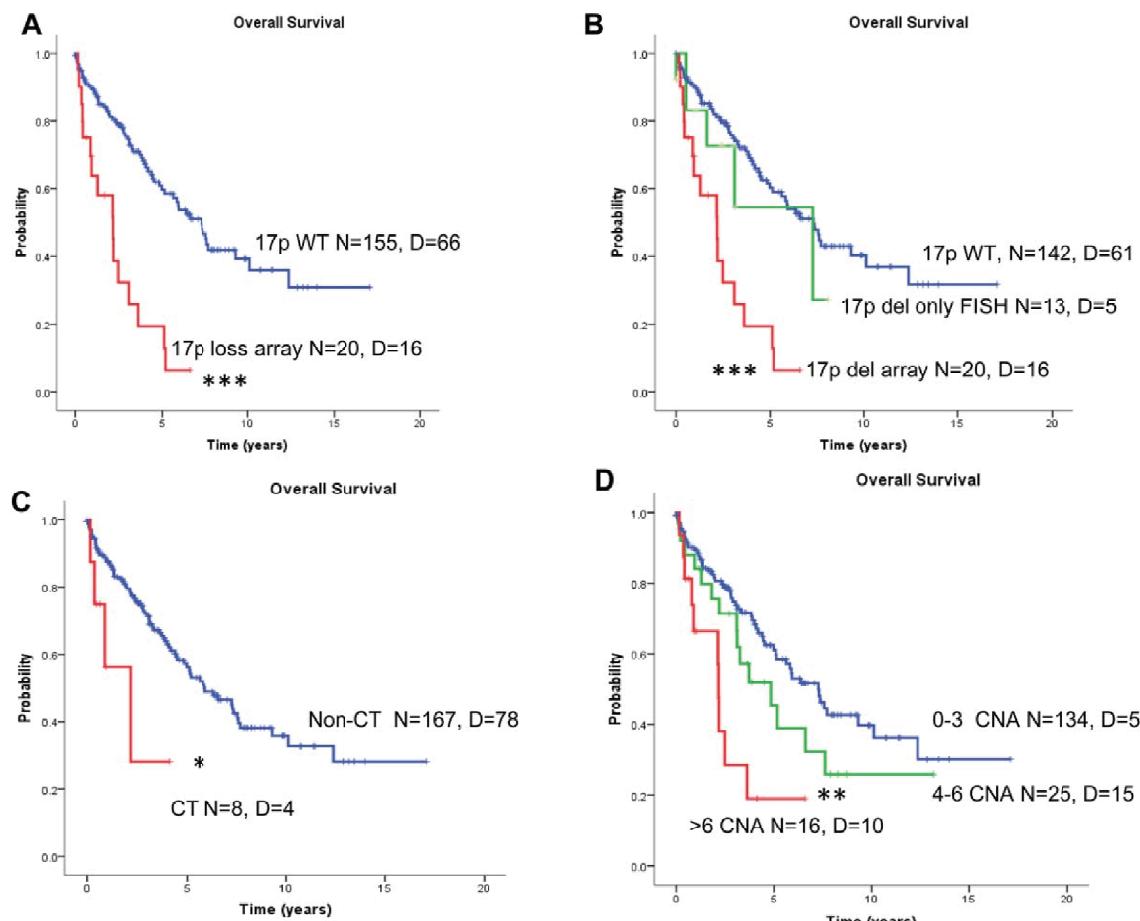


Figure 3. Overall survival (OS) analysis of CLL patients using the qChip®Hemo array. (A) Patients with 17p loss had a significantly shorter OS compared with patients without the 17p deletion. (B) Patients with 17p deletion detected by array had shorter OS compared with patients with 17p deletion detected only by FISH (10–17% cells in all cases), and patients without 17p deletion. (C) Patients with

chromothripsis show significantly shorter OS compared with cases without. (D) Kaplan-Meier plot of OS of CLL patients according to increasing number of CNAs (0–3, vs. 4–6 vs. >6 alterations). (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$). CT, chromothripsis; D, deceased; N, number; WT, wild-type (not deleted). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

et al., 2012; Mian et al., 2013). Moreover, Mian et al., 2013 found that large alterations could also further predict the outcome in the substantial subgroup (20%) of CLL patients with a normal FISH for the 11q22-q23, 13q14, chromosome 12, and 17p13 regions. In addition, several studies show that the presence of genomic complexity in CLL is important for identifying high-risk patients, which could have been missed or misclassified by using the standard FISH CLL panel alone. In that sense, the array that we have developed has been able to detect the more frequent regions altered in CLL genomes, with expected frequencies as well as other more focal alterations. Moreover, 11q losses and the presence of two or more CNAs detected by the array were related to shorter TTT, whereas 17p loss, increased genomic complexity, and chromothripsis were associated with

shorter overall survival. Furthermore, as has been previously reported (Dicker et al., 2009; Delgado et al., 2014), CLL cases with 17p13 alterations more frequently have complex karyotypes and poor overall survival. Interestingly, in the present study, we demonstrate that patients with 17p loss detected only by FISH in minor subpopulations (<17%), but not detected by array, behave similarly to patients without 17p loss. This suggests that the lower sensitivity of the array compared to FISH in detecting these small subclones with alteration may not have a direct impact on worse survival.

We here show that qChip®Hemo array data are concordant with FISH and high density array data, and moreover, that this array can detect other alterations (not covered by the FISH panel) with prognostic significance and also complex patterns

of alterations in single chromosomes (suggestive of chromothripsis) that cannot be detected by FISH. This phenomenon was detected in eight cases of the present study (4.4% incidence) and was related to poor overall survival. Chromothripsis was initially reported in two CLL cases by whole-genome sequencing (Campbell et al., 2010; Bassaganyas et al., 2013) and has been recently reported to identify a subset of CLL patients with worse prognosis (Edelmann et al., 2012). Of note, three of the cases with a chromothripsis-like pattern showed a highly altered 5p arm including gains of *TERT*. This gene at 5p13.33 encodes the telomerase reverse-transcriptase TERT that is rarely targeted by somatic chromosomal translocations and amplifications in B-cell neoplasms (Nagel et al., 2010). These data and our findings suggest that deregulation of the *TERT* gene by chromosomal abnormalities leading to increased telomerase activity might contribute to B-cell lymphomagenesis or even to catastrophic chromosomal reorganizations. However, further functional experiments will be needed to address this hypothesis. Note-worthy, alterations in the composition of telomeric proteins (including TERT) have been reported to be involved in the pathogenesis of CLL (Poncet et al., 2008). Moreover, susceptibility SNPs in the *TERT* and *POTI* genes, both involved in telomere function, have been described in a large series of CLL patients (Speedy et al., 2014).

Previous reports of targeted CN arrays for the analysis of CLL have not been applied in a clinical setting mainly because they did not fully achieve the goal of targeting the main CLL alterations. In 2004 and 2007, the first BAC/PAC array-CGH CLL platforms for clinical purposes were developed (Schwaenen et al., 2004; Patel et al., 2008). Despite their low resolution, both platforms showed high sensitivity and specificity compared with FISH. In 2009, a customized Agilent 4*44K array targeting 15 CLL commonly altered regions was reported (Sargent et al., 2009) with an average spacing of 5–11 kb in CLL regions. Another BAC array was reported in 2011 (Kolquist et al., 2011; Schultz et al., 2011). However, the major drawback for the clinical utility of this array was the lack of sufficient resolution to identify 13q14.3 and *ATM* losses. Recently, a new CLL customized Agilent 4*44K has been developed (Houldsworth et al., 2014), including 20 regions recurrently showing imbalances in CLL. The application of this platform to a large series of CLL cases revealed that gains of 2p, 3q, and 8q and losses of 8p have prognostic significance.

However, this array has not been compared with FISH data.

The qChip®Hemo array that we have designed and tested allows an exhaustive study of CNAs in a single experiment requiring only 300–600 ng of tumor DNA, without the need of cell culture, and can analyze, in a single experiment, genome-wide alterations. The qChip®Hemo array is also a less time-consuming and subjective technique compared with FISH. Additionally, with the introduction of a set of SNP probes in the latest version of the qChip®Hemo array also CNN-LOH could be assessed. Finally, the data reported herein support the qChip®Hemo as a cost-effective tool that could replace FISH in a clinical setting of patients with CLL or other B-cell neoplasms.

In conclusion, the present platform constitutes a robust, sensitive, and standardized tool based on a microarray that is able to detect recurrent CNAs in CLL and to properly capture their potential clinical impact. The similar overall performance, easier workflow, dramatic reduction of specialized hands-on time (crucial in cost calculations), and the whole-genome screening capacity make qChip®Hemo highly applicable for molecular testing of CLL, with the possibility to detect 17p and 11q losses, and also additional alterations with clinical impact (i.e., loss of 6q or 8p, gain of 2p of 8q, presence of high genomic complexity, and chromothripsis). The information provided by the array can be useful in the clinical setting by providing the clinicians objective and rapid information of genomic alterations. Risk-adapted therapy of CLL cases stratified based on their genomic alterations may be applied, with the option to vary the therapeutic strategy. However, the prognostic impact of new, focal and less frequent alterations, as well as chromothripsis, would require further studies in prospective clinical trials as well as the implementation of information about mutations of driver genes (i.e. *NOTCH1*, *SF3B1*, and *TP53*) with potential prognostic relevance.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are indebted to the Genomics core facility of the IDIBAPS and to HCB-IDIBAPS Biobank-Tumor Bank and Hematopathology Collection for sample procurement. They are grateful to Miriam Prieto, Cándida Gómez, Amparo Arias, Silvia Martín, and Cristina Capdevila for excellent technical assistance and Nathalie Villahoz and Carmen Muro for excellent work in the

coordination of the CLL Spanish Consortium. The authors thank the staff of the cytogenetic and molecular cytogenetic laboratories from the Institute of Human Genetics, Kiel, in particular Dr. Stefan Gesk, Dr. Lana Harder, Reina Zühlke-Jenisch, Claudia Becher, and Margret Ratjen for their excellent support. They are also very grateful to all patients with CLL who have participated in this study. This work was partially developed at the Centro Esther Koplowitz (CEK), Barcelona, Spain.

REFERENCES

- Austen B, Powell JE, Alvi A, Edwards I, Hooper L, Starczynski J, Taylor AM, Fegan C, Moss P, Stankovic T. 2005. Mutations in the ATM gene lead to impaired overall and treatment-free survival that is independent of IGHV mutation status in patients with B-CLL. *Blood* 106:3175–3182.
- Balatti V, Bottoni A, Palamarchuk A, Alder H, Rassenti LZ, Kipps TJ, Pekarsky Y, Croce CM. 2012. NOTCH1 mutations in CLL associated with trisomy 12. *Blood* 119:329–331.
- Baliakas P, Iskas M, Gardiner A, Davis Z, Plevova K, Nguyen-Khac F, Malcikova J, Anagnostopoulos A, Glide S, Mould S, Stepanovska K, Brejcha M, Belessi C, Davi F, Pospisilova S, Athanasiadou A, Stamatopoulos K, Oscier D. 2014. Chromosomal translocations and karyotype complexity in chronic lymphocytic leukemia: A systematic reappraisal of classic cytogenetic data. *Am J Hematol* 89:249–255.
- Bassaganyas L, Bea S, Escaramis G, Tornador C, Salaverria I, Zapara L, Drechsel O, Ferreira PG, Rodriguez-Santiago B, Tubio JM, Navarro A, Martin-Garcia D, Lopez C, Martinez-Trillo A, Lopez-Guillermo A, Gut M, Ossowski S, Lopez-Otin C, Campo E, Estivill X. 2013. Sporadic and reversible chromothripsis in chronic lymphocytic leukemia revealed by longitudinal genomic analysis. *Leukemia* 27:2376–2379.
- Braggio E, Kay NE, Vanwier S, Tschumper RC, Smoley S, Eckel-Passow JE, Sassoon T, Barrett M, Van Dyke DL, Byrd JC, Jelinek DF, Shanafelt TD, Fonseca R. 2012. Longitudinal genome-wide analysis of patients with chronic lymphocytic leukemia reveals complex evolution of clonal architecture at disease progression and at the time of relapse. *Leukemia* 26:1698–1701.
- Brown JR, Hanna M, Tesar B, Werner L, Pochet N, Asara JM, Wang YE, Dal CP, Fernandes SM, Thompson C, Macconnail L, Wu CJ, Van de PY, Correll M, Regev A, Neuberg D, Freedman AS. 2012. Integrative genomic analysis implicates gain of PIK3CA at 3q26 and MYC at 8q24 in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 18:3791–3802.
- Campbell PJ, Yachida S, Mudie LJ, Stephens PJ, Pleasance ED, Stubbings LA, Morsberger LA, Latimer C, McLaren S, Lin ML, McBride DJ, Varela I, Nik-Zainal SA, Leroy C, Jia M, Menzies A, Butler AP, Teague JW, Griffin CA, Burton J, Swerdlow H, Quail MA, Stratton MR, Iacobuzio-Donahue C, Futreal PA. 2010. The patterns and dynamics of genomic instability in metastatic pancreatic cancer. *Nature* 467:1109–1113.
- Catovsky D, Richards S, Matutes E, Oscier D, Dyer MJ, Bezards RF, Pettitt AR, Hamblin T, Milligan DW, Child JA, Hamilton MS, Dearden CE, Smith AG, Bosanquet AG, Davis Z, Brito-Babapulle V, Else M, Wade R, Hillmen P. 2007. Assessment of fludarabine plus cyclophosphamide for patients with chronic lymphocytic leukaemia (the LRF CLL4 Trial): A randomised controlled trial. *Lancet* 370:230–239.
- Chapiro E, Leporrier N, Radford-Weiss I, Bastard C, Mossafa H, Leroux D, Tigaud I, De BM, Terre C, Brizard F, Callet-Bauchu E, Struski S, Veronese L, Fert-Ferrer S, Taviaux S, Lesty C, Davi F, Merle-Beral H, Bernard OA, Sutton L, Raynaud SD, Nguyen-Khac F. 2010. Gain of the short arm of chromosome 2 (2p) is a frequent recurring chromosome aberration in untreated chronic lymphocytic leukemia (CLL) at advanced stages. *Leuk Res* 34:63–68.
- Delgado J, Salaverria I, Baumann T, Martinez-Trillo A, Lee E, Jimenez L, Navarro A, Royo C, Santacruz R, Lopez C, Payer AR, Colado E, Gonzalez M, Armengol L, Colomer D, Pinyol M, Villamor N, Aymerich M, Carrio A, Costa D, Clot G, Gine E, Lopez-Guillermo A, Campo E, Bea S. 2014. Genomic complexity and IGHV mutational status are key predictors of outcome of chronic lymphocytic leukemia patients with TP53 disruption. *Haematologica* 99:e231–e234.
- Dicker F, Herholz H, Schnittger S, Nakao A, Patten N, Wu L, Kern W, Haferlach T, Haferlach C. 2009. The detection of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia independently predicts rapid disease progression and is highly correlated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia* 23: 117–124.
- Dohner H, Fischer K, Bentz M, Hansen K, Benner A, Cabot G, Diehl D, Schlenk R, Coy J, Stilgenbauer S. 1995. p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood* 85: 1580–1589.
- Dohner H, Stilgenbauer S, James MR, Benner A, Weilguni T, Bentz M, Fischer K, Hunstein W, Lichter P. 1997. 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood* 89:2516–2522.
- Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, Dohner K, Bentz M, Lichter P. 2000. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 343:1910–1916.
- Edelmann J, Holzmann K, Miller F, Winkler D, Buhler A, Zenz T, Bullinger L, Kuhn MW, Gerhardinger A, Blochdorn J, Radtke J, Su X, Ma J, Pounds S, Hallek M, Lichter P, Korbel J, Busch R, Mertens D, Downing JR, Stilgenbauer S, Dohner H. 2012. High-resolution genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia reveals new recurrent genomic alterations. *Blood* 120:4783–4784.
- Farooqui MZ, Valdez J, Martyr S, Aue G, Saba N, Niemann CU, Herman SE, Tian X, Marti G, Soto S, Hughes TE, Jones J, Lipsky A, Pittaluga S, Stettler-Stevenson M, Yuan C, Lee YS, Pedersen LB, Geisler CH, Calvo KR, Arthur DC, Marie I, Childs R, Young NS, Westermark A. 2015. Ibrutinib for previously untreated and relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia with TP53 aberrations: A phase 2, single-arm trial. *Lancet Oncol* 16:169–176.
- Forconi F, Rinaldi A, Kwee I, Sozzi E, Raspadori D, Rancoita PM, Scandurra M, Rossi D, Deambrogi G, Capello D, Zucca E, Marconi D, Bomber R, Gattei V, Lauria F, Gaidano G, Bertoni F. 2008. Genome-wide DNA analysis identifies recurrent imbalances predicting outcome in chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion. *Br J Haematol* 143:532–536.
- Gunn SR, Mohammed MS, Gorre ME, Cotter PD, Kim J, Bahler DW, Preobrazhensky SN, Higgins RA, Bolla AR, Ismail SII, de JD, Eldering E, van Oers MH, Mellink CH, Keating MJ, Schlette EJ, Abruzzo LV, Robetore RS. 2008. Whole-genome scanning by array comparative genomic hybridization as a clinical tool for risk assessment in chronic lymphocytic leukemia. *J Mol Diagn* 10:442–451.
- Gunn SR, Hibbard MK, Ismail SH, Lowery-Nordberg M, Mellink CH, Bahler DW, Abruzzo LV, Enriquez EL, Gorre ME, Mohammed MS, Robetore RS. 2009. Atypical 11q deletions identified by array CGH may be missed by FISH panels for prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 23:1011–1017.
- Gunnarsson R, Isaksson A, Mansouri M, Goransson H, Jansson M, Cahill N, Rasmussen M, Staaf J, Lundin J, Norin S, Buhl AM, Smedby KE, Hjalgrim H, Karlsson K, Jurlander J, Juliusson G, Rosenquist R. 2010. Large but not small copy-number alterations correlate to high-risk genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia: A high-resolution genomic screening of newly diagnosed patients. *Leukemia* 24:211–215.
- Gunnarsson R, Mansouri L, Isaksson A, Goransson H, Cahill N, Jansson M, Rasmussen M, Lundin J, Norin S, Buhl AM, Smedby KE, Hjalgrim H, Karlsson K, Jurlander J, Geisler C, Juliusson G, Rosenquist R. 2011. Array-based genomic screening at diagnosis and during follow-up in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 96:1161–1169.
- Hagenkord JM, Monzon FA, Kash SF, Lilleberg S, Xie Q, Kant JA. 2010. Array-based karyotyping for prognostic assessment in chronic lymphocytic leukemia: Performance comparison of Affymetrix 10K2.0, 250K Nsp, and SNP6.0 arrays. *J Mol Diagn* 12:184–196.

- Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Dohner H, Hillmen P, Keating MJ,Montserrat E, Rai KR, Kipps TJ. 2008. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: A report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* 111:5446–5456.
- Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, Fink AM, Busch R, Mayer J, Hensel M, Hopfinger G, Hess G, von GU, Bergmann M, Catalano J, Zinzani PL, Caligaris-Cappio F, Seymour JF, Berrebi A, Jager U, Cazin B, Trneny M, Westermann A, Wendtner CM, Eichhorst BF, Staib P, Buhler A, Winkler D, Zenz T, Bottcher S, Ritgen M, Mendila M, Kneba M, Dohner H, Stilgenbauer S. 2010. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: A randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 376: 1164–1174.
- Houldsworth J, Guttpallali A, Thodima V, Yan XJ, Mendiratta G, Zielonka T, Nanjangud G, Chen W, Patil S, Matto A, Brown JR, Rai K, Chiorazzi N, Chaganti RS. 2014. Genomic imbalance defines three prognostic groups for risk stratification of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 55:920–928.
- Hudson TJ, Anderson W, Artez A, Barker AD, Bell C, Bernabe RR, Bhan MK, Calvo F, Eerola I, Gerhard DS, Guttman A, Guyer M, Hemsley FM, Jennings JL, Kerr D, Klatt P, Kolar P, Kusada J, Lane DP, Laplace F, Youyong L, Nettekoven G, Ozenberger B, Peterson J, Rao TS, Remacle J, Schafer AJ, Shibata T, Stratton MR, Vockley JG, Watanabe K, Yang H, Yuen MM, Knoppers BM, Bobrow M, Cambon-Thomsen A, Dressler LG, Dyke SO, Joly Y, Kato K, Kennedy KL, Nicolas P, Parker MJ, Rial-Sebbag E, Romeo-Casabona CM, Shaw KM, Wallace S, Wiesner GL, Zeps N, Lichter P, Biankin AV, Chabannon C, Chin L, Clement B, de AF, Degos F, Ferguson ML, Geary P, Hayes DN, Hudson TJ, Johns AL, Kasprzyk A, Nakagawa H, Penny R, Piris MA, Sarin R, Scarpa A, Shibata T, van d V, Futreal PA, Aburatani H, Bayes M, Botwell DD, Campbell PJ, Estivill X, Gerhard DS, Grimmond SM, Gut I, Hirst M, Lopez-Otin C, Majumder P, Marra M, McPherson JD, Nakagawa H, Ning Z, Puente XS, Ruan Y, Shibata T, Stratton MR, Stuinenberg HG, Swerdlow H, Velculescu VE, Wilson RK, Xue HH, Yang L, Spellman PT, Bader GD, Boutros PC, Campbell PJ, Flicek P, Getz G, Guigo R, Guo G, Haussler D, Heath S, Hubbard TJ, Jiang T, Jones SM, Li Q, Lopez-Bigas N, Luo R, Muthuswamy L, Ouellette BF, Pearson JV, Puente XS, Quesada V, Raphael BJ, Sander G, Shibata T, Speed TP, Stein LD, Stuart JM, Teague JW, Totoki Y, Tsunoda T, Valencia A, Wheeler DA, Wu H, Zhao S, Zhou G, Stein LD, Guigo R, Hubbard TJ, Joly Y, Jones SM, Kasprzyk A, Lathrop M, Lopez-Bigas N, Ouellette BF, Spellman PT, Teague JW, Thomas G, Valencia A, Yoshida T, Kennedy KL, Axton M, Dyke SO, Futreal PA, Gerhard DS, Gunter C, Guyer M, Hudson TJ, McPherson JD, Miller LJ, Ozenberger B, Shaw KM, Kasprzyk A, Stein LD, Zhang J, Haider SA, Wang J, Yung CK, Cross A, Liang Y, Gnaneshan S, Guberman J, Hsu J, Bobrow M, Chalmers DR, Hasel KW, Joly Y, Kaan TS, Kennedy KL, Knoppers BM, Lowrance WW, Masui T, Nicolas P, Rial-Sebbag E, Rodriguez LL, Vergely C, Yoshida T, Grimmond SM, Biankin AV, Bowtell DD, Cloonan N, defazio A, Eshleman JR, Etemadmoghadam D, Gardiner BA, Kench JG, Scarpa A, Sutherland RL, Temperton MA, Waddell NJ, Wilson PJ, McPherson JD, Gallinger S, Tsao MS, Shaw PA, Petersen GM, Mukhopadhyay D, Chin L, DePinho RA, Thayer S, Muthuswamy L, Shazand K, Beck T, Sam M, Timms L, Ballin L, Lu Y, Ji J, Zhang X, Chen F, Hu X, Zhou G, Yang Q, Tian G, Zhang L, Xing X, Li X, Zhu Z, Yu Y, Yu J, Yang H, Lathrop M, Tost J, Brennan P, Holekova I, Zaridze D, Brazma A, Egevard L, Prokhortchouk E, Banks RE, Uhlen M, Cambon-Thomsen A, Viksna J, Ponten F, Skryabin K, Stratton MR, Futreal PA, Birney E, Borg A, Borresen-Dale AL, Caldas C, Fockens JA, Martin S, Reis-Filho JS, Richardson AL, Sotiriou C, Stuinenberg HG, Thoms G, van d V, van't VL, Calvo F. 2010. International network of cancer genome projects. *Nature* 464:993–998.
- Kay NE, Eckel-Passow JE, Braggio E, Vanwier S, Shanafelt TD, Van Dyke DL, Jelinek DF, Tschumper RC, Kipps T, Byrd JC, Fonseca R. 2010. Progressive but previously untreated CLL patients with greater array CGH complexity exhibit a less durable response to chemoimmunotherapy. *Cancer Genet Cytoogenet* 203:161–168.
- Knight SJ, Yau C, Clifford R, Timbs AT, Sadighi AE, Dreau HM, Burns A, Ciria C, Oscier DG, Pettitt AR, Dutton S, Holmes CC, Taylor J, Cazier JB, Schuh A. 2012. Quantification of subclonal distributions of recurrent genomic aberrations in paired pre-treatment and relapse samples from patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 26:1564–1575.
- Kolquist KA, Schultz RA, Slovak ML, McDaniel LD, Brown TC, Tubbs RR, Cook JR, Theil KS, Cawich V, Valentini C, Minier S, Neill NJ, Byerly S, Morton SA, Sahoo T, Ballif BC, Shaffer LG. 2011. Evaluation of chronic lymphocytic leukemia by oligonucleotide-based microarray analysis uncovers novel aberrations not detected by FISH or cytogenetic analysis. *Mol Cytogenet* 4:25.
- Lopez C, Delgado J, Costa D, Villamor N, Navarro A, Cazorla M, Gomez C, Arias A, Munoz C, Cabezas S, Baumann T, Rozman M, Aymerich M, Colomer D, Pereira A, Cobo F, Lopez-Guillermo A, Campo E, Carrio A. 2013. Clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia: Analysis of correlations with IGHV mutational status, NOTCH1 mutations and clinical significance. *Genes Chromosomes Cancer* 52:920–927.
- Malek SN. 2013. The biology and clinical significance of acquired genomic copy number aberrations and recurrent gene mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Oncogene* 32:2805–2817.
- Mian M, Rinaldi A, Mensah AA, Rossi D, Ladetto M, Forconi F, Marasca R, Uhr M, Stussi G, Kwee I, Cavalli F, Gaidano G, Zucca E, Bertoni F. 2013. Large genomic aberrations detected by SNP array are independent prognosticators of a shorter time to first treatment in chronic lymphocytic leukemia patients with normal FISH. *Ann Oncol* 24:1378–1384.
- Murga Penas EM, Kawadler H, Siebert R, Frank M, Ye H, Hinz K, Becher C, Hummel M, Barth TF, Bokemeyer C, Stein H, Trumper L, Moller P, Marynen P, Du MQ, Yang X, Hansmann ML, Dierlamm J. 2006. A novel fusion of the MALT1 gene and the microtubule-associated protein 4 (MAP4) gene occurs in diffuse large B-cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 45:863–873.
- Nagel I, Szczepanowski M, Martin-Subero JI, Harder L, Akasaka T, Ammerpohl O, Callet-Bauchu E, Gascogne RD, Gesk S, Horzman D, Klapper W, Majid A, Martinez-Climent JA, Stilgenbauer S, Tonnes H, Dyer MJ, Siebert R. 2010. Derepression of the telomerase reverse transcriptase (TERT) gene by chromosomal translocations in B-cell malignancies. *Blood* 116:1317–1320.
- O'Malley DP, Giudice C, Chang AS, Chang D, Barry TS, Hibbard MK, Chen R, Chen ST. 2011. Comparison of array comparative genomic hybridization (aCGH) to FISH and cytogenetics in prognostic evaluation of chronic lymphocytic leukemia. *Int J Lab Hematol* 33:238–244.
- Ouillette P, Collins R, Shakhan S, Li J, Peres E, Kujawski L, Talpaz M, Kaminski M, Li C, Shedden K, Malek SN. 2011. Acquired genomic copy number aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 118:3051–3061.
- Patel A, Kang SH, Lennon PA, Li YF, Rao PN, Abruzzo L, Shaw C, Chinault AC, Cheung SW. 2008. Validation of a targeted DNA microarray for the clinical evaluation of recurrent abnormalities in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol* 83:540–546.
- Pfeifer D, Pantic M, Skatulla I, Rawluk J, Kreutz C, Martens UM, Fisch P, Timmer J, Veelken H. 2007. Genome-wide analysis of DNA copy number changes and LOH in CLL using high-density SNP arrays. *Blood* 109:1202–1210.
- Poncelet D, Belleville A, t'kint de RC, Roborel de CA Ben SE, Merle-Beral H, Callet-Bauchu E, Salles G, Sabatier L, Delic J, Gilson E. 2008. Changes in the expression of telomere maintenance genes suggest global telomere dysfunction in B-chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 111:2388–2391.
- Pospisilova S, Gonzalez D, Malcikova J, Tribusek M, Rossi D, Kater AP, Cymbalista F, Eichhorst B, Hallek M, Dohner H, Hillmen P, van OM, Gribben J, Ghia P, Montserrat E, Stilgenbauer S, Zenz T. 2012. ERIC recommendations on TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 26:1458–1461.
- Quesada V, Conde I, Villamor N, Ordonez GR, Jares P, Bassaganyas L, Ramsay AJ, Bea S, Pinyol M, Martinez-Trillo A, Lopez-Guerra M, Colomer D, Navarro A, Baumann T, Aymerich M, Rozman M, Delgado J, Gine E, Hernandez JM, Gonzalez-Diaz M, Puente DA, Velasco G, Freije JM, Tubio JM, Royo R, Gelpi JL, Orozco M, Pisano DG, Zamora J, Vazquez M, Valencia A, Himmelbauer H, Bayes M, Heath S, Gut M, Gut I, Estivill X, Lopez-Guillermo A, Puente XS,

- Campo E, Lopez OC. 2012. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* 44:47–52.
- Rausch T, Jones DT, Zapata M, Stutz AM, Zichner T, Weischenfeldt J, Jager N, Remke M, Shih D, Northcott PA, Pfaff E, Tica J, Wang Q, Massimi L, Witt H, Bender S, Pleier S, Cin H, Hawkins C, Beck C, von DA, Hans V, Brors B, Eils R, Scheurlen W, Blake J, Benes V, Kulozil AE, Witt O, Martin D, Zhang C, Porat R, Merino DM, Wasserman J, Jabado N, Fontebasso A, Bullinger L, Rucker FG, Dohner K, Dohner H, Koster J, Molenaar JJ, Versteeg R, Kool M, Tabori U, Malkin D, Korshunov A, Taylor MD, Lichter P, Pfister SM, Korbel JO. 2012. Genome sequencing of pediatric medulloblastoma links catastrophic DNA rearrangements with TP53 mutations. *Cell* 148:59–71.
- Rinaldi A, Mian M, Kwee I, Rossi D, Deambrogli C, Mensah AA, Forconi F, Spina V, Cencini E, Drandi D, Ladetto M, Santachiara R, Marasca R, Gattei V, Cavalli F, Zucca E, Gaidano G, Bertoni F. 2011. Genome-wide DNA profiling better defines the prognosis of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 154:590–599.
- Rosenquist R, Cortese D, Bhoi S, Mansouri L, Gunnarsson R. 2013. Prognostic markers and their clinical applicability in chronic lymphocytic leukemia: Where do we stand?. *Leuk Lymph* 54:2351–2364.
- Rossi D, Fangazio M, Rasi S, Vaisitti T, Monti S, Cresta S, Chiaretti S, Del G, Fabbri I, Bruscaggin G, Spina A, Deambrogli V, Marinelli C, Fama M, Greco R, Daniele M, Forconi G, Gattei F, Bertoni V, Deaglio F, Pasqualucci S, Guarini L, la-Favera A, Foa R, Gaidano RG. 2012. Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemoresistance in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 119: 2854–2862.
- Rossi D, Khiabanian H, Spina V, Ciardullo C, Bruscaggin A, Fama R, Rasi S, Monti S, Deambrogli C, De PL, Wang J, Gattei V, Guarini A, Foa R, Rabadian R, Gaidano G. 2014. Clinical impact of small TP53 mutated subclones in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 123:2139–2147.
- Royo G, Navarro A, Clot G, Salaverria I, Gine 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-Pabon M, Ott G, Rosenwald A, Siebert R, Lopez-Guillermo A, Campo E, Bea S. 2012. Non-nodal type of mantle cell lymphoma is a specific biological and clinical subgroup of the disease. *Lekemia* 26:1895–1898.
- Salaverria I, Royo C, Carvajal-Cuenca A, Clot G, Navarro A, Valera A, Song JY, Woroniczka R, Rymkiewicz G, Klapper W, Hartmann EM, Sujober P, Włodarska I, Ferry JA, Gaulard P, Ott G, Rosenwald A, Lopez-Guillermo A, Quintanilla-Martinez L, Harris NL, Jaffe ES, Siebert R, Campo E, Bea S. 2013. CCND2 rearrangements are the most frequent genetic events in cyclin D1(-) mantle cell lymphoma. *Blood* 121:1394–1402.
- Sargent R, Jones D, Abruzzo LV, Yao H, Bonderover J, Cisneros M, Wierda WG, Keating MJ, Luthra R. 2009. Customized oligonucleotide array-based comparative genomic hybridization as a clinical assay for genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia. *J Mol Diagn* 11:25–34.
- Schultz RA, Delfoukina M, Gaal K, Bedell V, Smith DD, Forman SJ, McDaniel LD, Ballif BC, Shaffer LG, Slovak ML. 2011. Evaluation of chronic lymphocytic leukemia by BAC-based microarray analysis. *Mol Cytogenet* 4:4.
- Schwaenen C, Nessling M, Wessendorf S, Salvi T, Wrobel G, Radlwimmer B, Kestler HA, Haslinger C, Stilgenbauer S, Dohner H, Bentz M, Lichter P. 2004. Automated array-based genomic profiling in chronic lymphocytic leukemia: Development of a clinical tool and discovery of recurrent genomic alterations. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:1039–1044.
- Shaffer LG, McGowan-Jordan J, Schmid M. 2013. ISCN 2013: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Basel: Karger.
- Shi M, Cipollini MJ, Crowley-Bish PA, Higgins AW, Yu H, Miron PM. 2013. Improved detection rate of cytogenetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia and other mature B-cell neoplasms with use of CpG-oligonucleotide DSP30 and interleukin 2 stimulation. *Am J Clin Pathol* 139:662–669.
- Skowronka A, Parker A, Ahmed G, Oldrieve C, Davis Z, Richards S, Dyer M, Matutes E, Gonzalez D, Taylor AM, Moss P, Thomas P, Oscier D, Stankovic T. 2012. Biallelic ATM inactivation significantly reduces survival in patients treated on the United Kingdom Leukemia Research Fund Chronic Lymphocytic Leukemia 4 trial. *J Clin Oncol* 30:4524–4532.
- Speedy HE, Di Bernardo MC, Sava GP, Dyer MJ, Holroyd A, Wang Y, Sunter NJ, Mansouri L, Juliussón G, Smedby KE, Roos G, Jayne S, Majid A, Dearden C, Hall AG, Mainou-Fowler T, Jackson GH, Summerfield G, Harris RJ, Pettitt AR, Allsup DJ, Bailey JR, Pratt G, Pepper C, Fegan C, Rosenquist R, Catovsky D, Allan JM, Houlston RS. 2014. A genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* 46:56–60.
- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pilieri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW, editors. 2008. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC.
- Villamor N, Conde L, Martinez-Trillo A, Cazorla M, Navarro A, Bea S, Lopez C, Colomer D, Pinyol M, Aymerich M, Rozman M, Abrisqueta P, Baumann T, Delgado J, Gine E, Gonzalez-Diaz M, Hernandez JM, Colado E, Payer AR, Rayon C, Navarro B, Jose TM, Bosch F, Quesada V, Puente XS, Lopez-Otin C, Jares P, Pereira A, Campo E, Lopez-Guillermo A. 2013. NOTCH1 mutations identify a genetic subgroup of chronic lymphocytic leukemia patients with high risk of transformation and poor outcome. *Leukemia* 27:1100–1106.
- Zenz T, Krober A, Scherer K, Habe S, Buhler A, Benner A, Denzel T, Winkler D, Edelmann J, Schwanen C, Dohner H, Stilgenbauer S. 2008. Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: Results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. *Blood* 112:3322–3329.
- Zenz T, Habe S, Denzel T, Mohr J, Winkler D, Buhler A, Sarno A, Groner S, Mertens D, Busch R, Hallek M, Dohner H, Stilgenbauer S. 2009. Detailed analysis of p53 pathway defects in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): dissecting the contribution of 17p deletion, TP53 mutation, p53-p21 dysfunction, and miR34a in a prospective clinical trial. *Blood* 114:2589–2597.
- Zenz T, Mertens D, Kuppers R, Dohner H, Stilgenbauer S. 2010. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer* 10:37–50.
- Zenz T, Mertens D, Dohner H, Stilgenbauer S. 2011. Importance of genetics in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Rev* 25: 131–137.

SUPPORTING INFORMATION

Salaverria et al.

Supplementaty Table S1. Coverage of the different regions enriched in the qChip®Hemo array compared to coverage in Affymetrix SNP6.0 array (GRCh37/hg19).

Chr	Start	End	Size (kb)	Region	Target genes	qChip®Hemo array		SNP6.0 array	
						No. probes	probes/Kb	No. probes	probes/Kb
chr8	128747629	128753930	6.3	8q24.21	MYC	53	8.41	0	0
chr2	60676446	60782012	105.6	2p16.1	BCL11A	880	8.34	65	0.62
chr11	108082602	108252729	170.1	11q22.3	ATM	1418	8.33	78	0.46
chr17	7563917	7591659	27.7	17p13.1	TP53	231	8.33	16	0.58
chr2	61104447	61151158	46.7	2p16.1	REL	389	8.33	20	0.43
chr2	231090445	231223847	133.4	2q37.1	SP140	1047	7.85	69	0.52
chr2	111878490	111926022	47.5	2q13	BCL2L11	365	7.68	11	0.23
chr2	60500000	61500000	1000	2p16.1-p15	BCL11A, REL	1831	1.83	571	0.57
chr9	21798721	22125806	327.1	9p21.3	MTAP, CDKN2A, CDKN2B	542	1.66	220	0.67
chr2	230055752	231666905	1611.2	2q36.3-q37.1	SP110, SP140, SP100	2046	1.27	1002	0.62
chr13	48007849	54010887	6003	13q14.2-q14.3	RB1, DLEU2, DLEU1, MIR16-1, MIR15A	5098	0.85	3625	0.6
chr17	6500001	10700000	4200	17p13.1	TP53	3023	0.72	2639	0.63
chr14	106328955	106808955	480	14q32.3-3	IGH	320	0.67	195	0.41
chr18	56250406	61070906	4820.5	18q21.3-2-q21.33	MALT1, BCL2	3214	0.67	3570	0.74
chr2	16050000	16150000	100	2p24.3	MYCN	67	0.67	59	0.59
chr2	89118885	89438885	320	2p11.2	IGK	213	0.67	160	0.5
chr2	111376353	111977326	601	2q13	BUB1, ACOXL, BCL2L11	240	0.4	191	0.3
chr3	46996537	48502973	1506	3p21.31	SETD2, MAP4, CDC25A, FBXW12	603	0.4	162	0.1
chr10	103818600	104498019	679	10q24.3-2	GBF1, NFKB2, PSD, FBXL5, SUFU	272	0.4	90	0.1
chr11	106000000	118000000	12000	11q22.3-q23.3	-	2398	0.2	8387	0.7
chr6	78000000	120000000	42000	6q14.1-q22.31	-	3376	0.08	26861	0.64
chr7	124449746	136150979	11701.2	7q31.33-q33	-	955	0.08	7582	0.65

Supplementary Table S2. Genetic alterations in 180 CLL cases hybridized using qChip®Hemo array (GRCh37/hg19). This table is provided separately in excel format.

Supplementary Table S3. Comparison of qChip®Hemo array with FISH and cytogenetics. (A) FISH data for 11q, 13q14, trisomy 12 and 17p loss; and (B) conventional cytogenetics (CC) data for 11q, trisomy 12 and 17p loss. (PPV: positive predicted value; NPV: negative predicted value).

A

FISH 11q			
	Wt	Loss	Total
11q qChip®	Wt	66	66
	Loss	0	31
	Total	66	97

$\kappa=1.00$ (Perfect); standard error = 0.000

Fisher's exact test *P*-value < 0.001

Sensitivity 100%; Specificity 100%

PPV 100%; NPV 100%

FISH 12			
	Wt	Gain	Total
12 qChip®	Wt	82	82
	Gain	0	20
	Total	82	102

$\kappa=1.00$ (Perfect); standard error = 0.000

Fisher's exact test *P*-value < 0.001

Sensitivity 100%; Specificity 100%

PPV 100%; NPV 100%

FISH 13q14			
	Wt	Loss	Total
13q14 qChip®	Wt	40	50
	Loss	0	54
	Total	40	104

$\kappa=0.806$ (Strong); standard error = 0.057

Fisher's exact test *P*-value < 0.001

Sensitivity 84%; Specificity 100%

PPV 100%; NPV 80%

FISH 17p			
	Wt	Loss	Total
17p qChip®	Wt	76	89
	Loss	0	13
	Total	76	102

$\kappa=0.598$ (Moderate); standard error = 0.095

Fisher's exact test *P*-value < 0.001

Sensitivity 50%; Specificity 100%

PPV 100%; NPV 85%

B

CC 11q			
	Wt	Loss	Total
11q qChip®	Wt	45	0
	Loss	5	15
	Total	50	15
			65

$\kappa=0.806$ (Strong); standard error = 0.082

Fisher's exact test P -value < 0.001

CC 12			
	Wt	Gain	Total
12 qChip®	Wt	43	0
	Gain	6	16
	Total	49	16
			65

$\kappa=0.779$ (Strong); standard error = 0.084

Fisher's exact test P -value < 0.001

CC 17p			
	Wt	Loss	Total
17p qChip®	Wt	52	2
	Loss	3	8
	Total	55	10
			65

$\kappa=0.716$ (Good); standard error = 0.119

Fisher's exact test P -value < 0.001

Supplementary Table S4. Discrepancies observed in the comparison between qChip®Hemo and FISH data of 106 CLL patients.

Case	+12 array	+12 FISH (%)	-13q array	-13q FISH (%)	-11q array	-11q FISH (%)	-17p array	-17p FISH (%)
070	0	0	0	11	0	nd	0	nd
079	0	nd	0	22	0	nd	0	nd
094	0	0	0	14	0	0	yes	40
116	0	0	0	12	0	0	0	0
181	0	0	yes	83	0	0	0	12
238	0	0	0	12	0	0	0	0
306	0	0	0	10	yes	75	0	13
384	0	0	yes	99	yes	82	0	14
385	yes	20	0	0	0	0	0	13
399	0	0	0	22	yes	95	0	10
587	0	0	0	21	0	nd	yes	53
667	0	0	yes	93	0	0	0	10
827	0	0	0	0	0	0	0	12
896	yes	82	0	9	0	nd	0	17
1096	0	nd	yes	98	0	nd	0	13
1278	0	0	0	14	0	0	0	10
1279	yes	50	yes	88	0	0	0	13
1282	0	0	yes	45	0	0	0	13
1283	0	0	yes	97	0	nd	0	12
L1107	yes	86	0	17	0	0	0	0

nd, not determined.

Soft grey indicates alterations detected by FISH but not by array, all of them were present in less than 22% of cells by FISH for 13q14 region and in less than 17% of cell for 17p13 region.

Supplementary Table S5. Conventional cytogenetics of 93 CLL patients.

Case	Karyotype
006	46,XX,del(11)(q14)[2]/46,XX[15]
010	46,XY[20]
023	46,XX[4]
024	47,XY,+12[7]/46,XY[13]
038	46,XY,del(13)(q14.3q21),?del(14)(q32)[3]/46,XY[17]
049	46,XX,del(6)(q21)[2]/46,XX[18]
053	45,X,-Y[3]/46,XY[17]
067	46,XY[50]
070	46,XY[30]
074	46,XY[20]
077	46,XX,del(6)(q21),add(16)(q23)[17]/46,XX[11]
079	45,XY,-13,der(11)t(11;13)[2]/46,XY[14]
087	49,XY,+12,+18,+19[15]/46,XY[5]
092	47,XY,+12[3]/46,XY[21]
093	46,XY,del(6)(q22q23)[18]/46,XY[26]
096	46,XX[20]
111	46,XY,del(13)(q14q21)[6]/46,XY[39]
112	46,XX[20]
116	46,XY[20]
143	49-50,XY,+Y,+12,+18,+18,+18,+19[cp11]/46,XY[9]
162	46,XX,del(13)(q13q21)[9]/46,XX[11]
163	47,XX,+12[9]/46,XX[41]
169	46,XY[16]
181	46,XY[5]
199	46,XY[20]
289	46,XX[20]
290	46,XX,del(11)(q21)[15]/46,XX[5]
306	46,XY,del(2)(p23),add(3)(p24),del(6)(q22q24),add(17)(p13)[cp18]/46,XY[4]
375	46,XY,del(13)(q14q21)[4]/46,XY[16]
384	45,X,-X[3]/46,XX[17]
385	46,XY[20]
390	46,XY,del(13)(q14q21)[6]/46,XY[14]
418	45,XX,-15,der(17)t(15;17)(q?11.2;p?11.2)[5]/46,XX[21]
431	46,XY[34]
436	46,XY,del(6)?(q24q26)[5]/46,XY[15]
448	46,XY[20]
460	47,XY,+12[28]/46,XY[23]
507	46,XX[24]
511	45,XY,del(17)(p11.2)[1]/46,XY,add(14)(q32),der(17)[10]/46,XY[6]
520	46,XY[20]
527	46,XY[20]
537	46,XY[20]
553	46,XX[15]
587	46,XY[20]
605	46,XY,add(19)(q13.4)[25]/45,XY,der(2) t(2;6)(p23;p12),del(6)(q?),-20, del(21)(q22)[5]/46,XY[21]

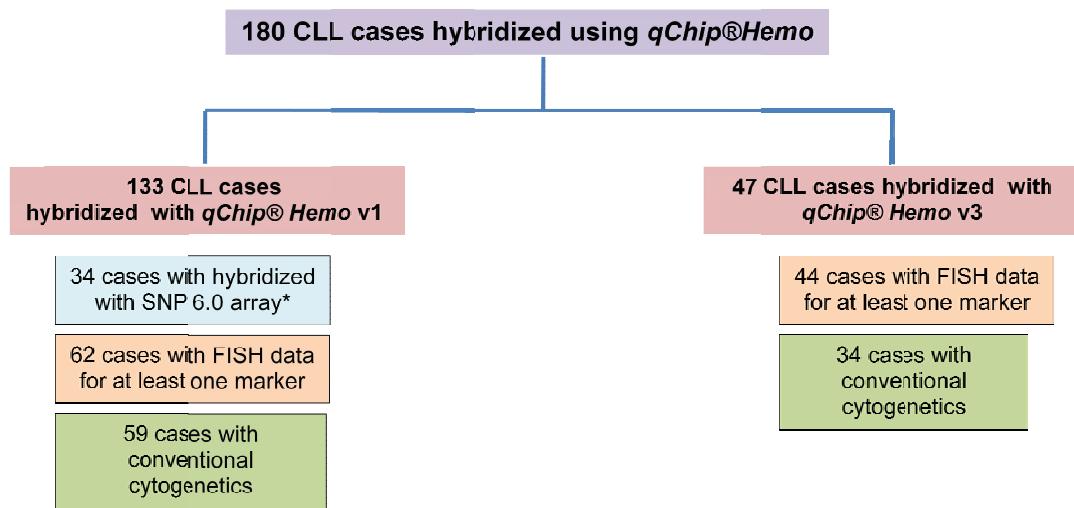
631	47,XY,+12,add(19)(p13.3)[3]/47,XY,dic(19;?)(p13.3;?),add(X)(p22),+mar[2]/46,XY[17]
669	46,XY[20]
711	47,XY,+12,t(14;18)(q32;q21)[24]/46,XY[26]
724	46,XX,del(13)(q14q21)[4]/46,XX[7]
793	45,X,-X[3]/46,XX,del(17)(p13)[2]/46,XX[16]
827	46,XX,del(6)(q13q26)[11]/46,XX[1]
896	47,XY,+12,del(13)(q14q21), t(14;18)(q32;q21),del(17)(p13)[2]/46,XY[5]
1096	46,XY[20]
1278	46,XY[20]
1279	46,XX,inv(3)(p25q13.2)[12]/48,idem,+3,t(3;13)(q13.2;q14),+12[8]
1281	45,XY,der(5)ins(5;13)(q?;q?q?),-13,[5]/45,idem,del(17)(p10)[3]/46,XY[21]
1282	46,XX,del(13)(q14q21)[4]/46,XX[16]
1284	46,XY[20]
1286	46,XY,del(13)(q14q21)[2]/46,idem,del(17)(p12)[5]/46,idem, der(13)t(13;17)(q14;q23), der(17)del(17)(p12)t(13;17)(q14;q23)[5]/46,XY[8]
D1013	46,XY,del(11)(q14q24), del(13)(q14q21)[8]/46,XY[12].
D1014	47,XX,+12[1]/46,XX[19].
D1016	40~43,X,-Y,add(3)(q23),-5,der(7)t(7;?8)(q22;?q22),-8,der(11)t(?;11)(?;p10),der(12)t(8;12)(q12;p13),der(13;14)(q10,q10)c,der(17;18)(q10;q10),der(17)t(?5;17)(q22~q23;q25),+r[cp15]/45,XY,der(13;14)(q10;q10)cp[6]
D1017 ^a	47,XY,+12[16]/46,XY[2].
D1022 ^a	47,XX,+12[12]/46,XX[4]
D1023 ^a	47,XY,+12[4]/46,XY[17]
D1024 ^a	46,XY,t(3;7;13)(p22;q11;q14),t(7;16)(p14;p12)del(16)(q12~13)[10]
D1033 ^a	46,XX,t(9;13)(p12;q14),del(13)(q12q14),del(13)(q12q31),del(13)(q12q21)[8]
D1037 ^a	47,XX,+12,del(14)(q21q32)[10]/46,XX[10].
D1044 ^a	46,XY,add(13)(q12),der(17)t(?13;17)(q21;q21)
D1045 ^a	46,XX,t(5;22)(q11;p13)[10]/46,XX[2]
D1072 ^a	48,XY,+12,+19[12]/46,XY[8]
D1073 ^a	45,XY,t(3;8)(p24;q24),del(5)(q12q23),del(13)(q13q31), der(17)t(17,18)(p11;q11),-18[cp 9]/46,XY[1]
D1089	44,dic(X;16)(q28;q12),X,add(5)(p10),add(7)(q31),dic(15;21)(p13;p13),i(17)(q10),add(18)(p11),add(21)(p10)[cp15]/46,XX[4]
D964 ^a	45,XX,del(11)(q14q32),del(13)(q13q33),der(16)t(16;17)(q23~24;q21), der(17)t(17;?18)(q21;q21),-20[15]/46,XX[6].
D966 ^a	47,XY,t(4;21)(q13;p13),del(11)(q14q24),+12[13]/46,XY[2].
D968 ^a	46,XY,inv(9)(p12q13),del(11)(q14q25)[17]/46,XY,inv(9)(p12q13)cp[2]
D969 ^a	46,XY,del(11)(q14~22q24),del(13)(q13q14)[15]/46,XY[4]
D970 ^a	46,XY,del(11)(q14q23),add(18)(p11.3)[9]/46,XY[11]
D972 ^a	47,XX,del(11)(q22q24),+12[9]/46,XX[6].
D978 ^a	46,XX,del(11)(q14q24)[4]/46,XX[16].
D981 ^a	46,XX,del(11)(q14q24),del(13)(q14q21)[5]/46,XX[9]
D983 ^a	46,XY,del(11)(q14q24)[6]/46,XY[4].
D986 ^a	46,XY,del(11)(q14q23),del(13)(q14q21)[2].
D990 ^a	40~43,XY,der(3)t(1;3)(p35;p26),ins(3;?)(q21;?),del(8)(p?),del(12)(q21), add(17)(p11),inc[8].
D993 ^a	46,XY,del(11)(q14q25),del(13)(q13q14)[2]/46,XY[1]
D1094 ^a	46,XX,t(13;16)(q14;p12),der(14)t(14;18)(q32;q21)[14]
D1151 ^a	46,XY,del(11)(q14q23),del(13)(q13q14)[18]/46,XY[1]

D1159^a	45,XY,der(1)t(1;1)(p36;q31),del(4)t(4;17)(p15;q12~21),der(9)t(3;9)(q21;q34),-17,add(18)(p13)[10]
L1059	46,XY,add(4)(p1?),add(13)(q3?)[2]/46,XY[9]
L1107	47,XX,+12[3]
L1378	46,XX[18]
L1561	46,XY[20]
L1884	46,XX[13]

Only cytogenetic data obtained within less than 6 months of difference from the DNA sample date were considered.

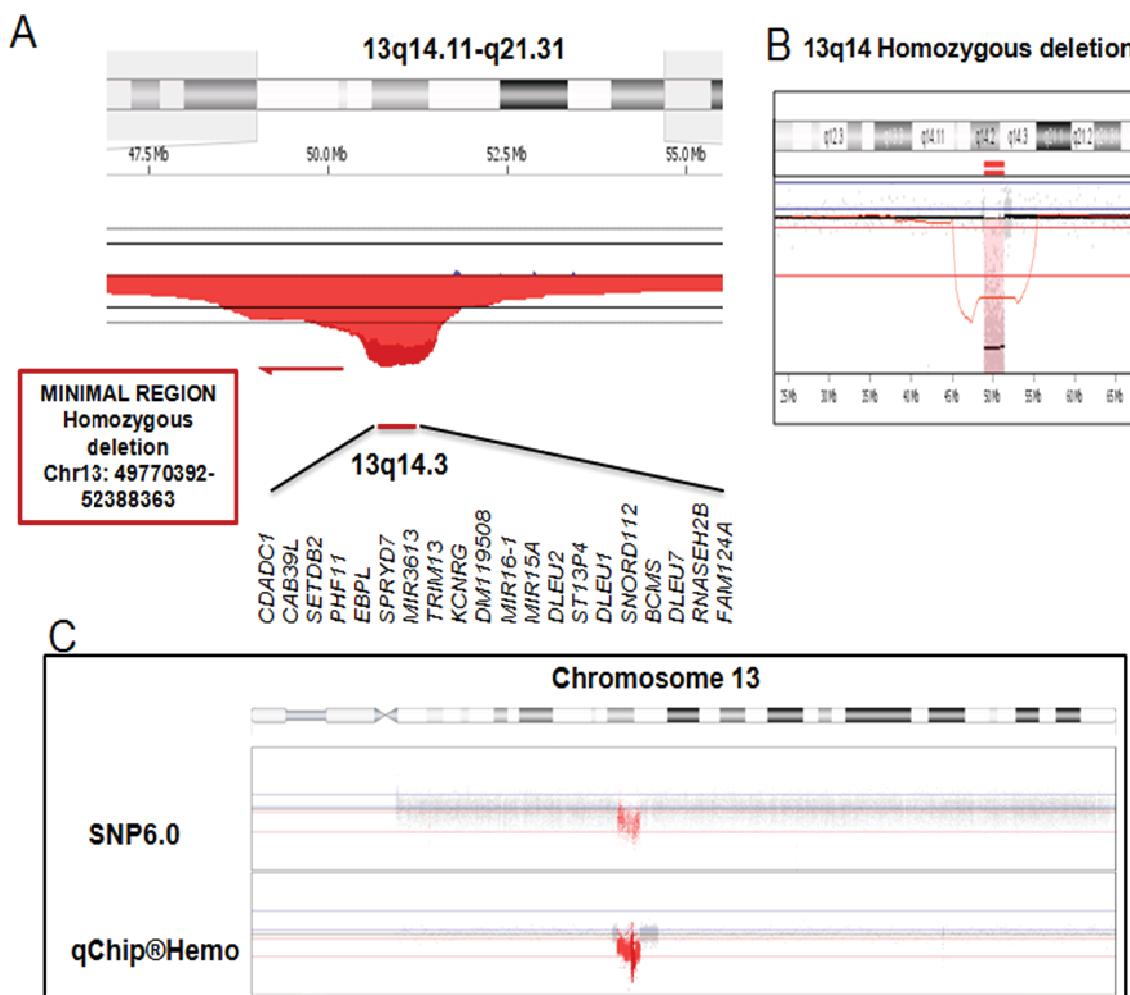
^aDSP30 stimulation.

Supplementary Figure S1. Schematic representation of number of cases studied by molecular and genetic techniques.

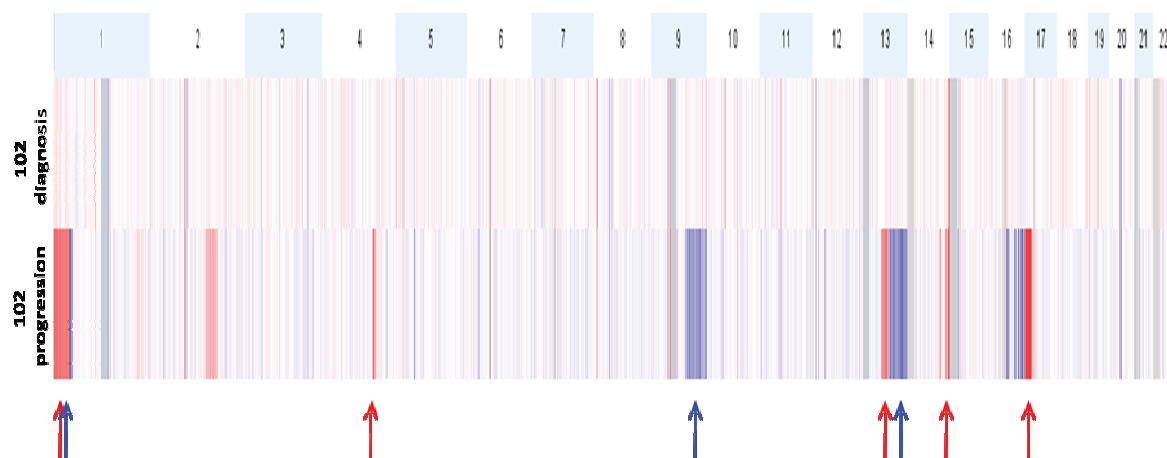


*All 34 cases with SNP 6.0 data have FISH information

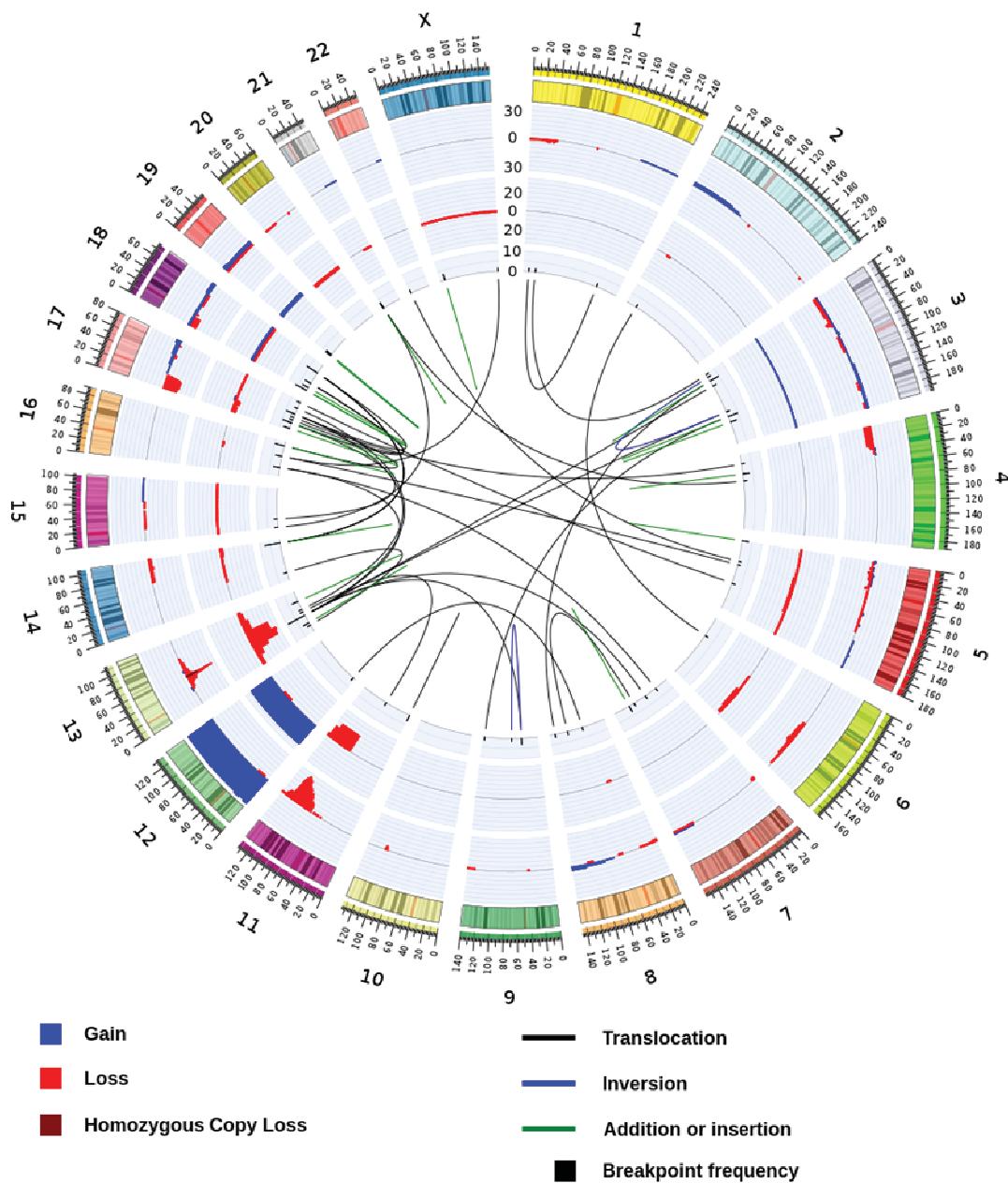
Supplementary Figure S2. Detailed 13q14 losses in CLL detected by qChip®Hemo array. (A) All CLL cases with 13q loss highlighting the minimal lost region 13q14.3 (encompassing *DLEU2* and the two microRNAs *MIR15A* and *MIR16-1*, and other few neighbor genes). Cases with homozygous deletion are highlighted in dark red. (B) Detailed 13q14.2-q14.3 region of case D793 with a broad homozygous deletion. (C) Chromosome 13 (case 34) in which by qChip®Hemo array a 13q14.3 homozygous deletion was detected (dark red colored in the middle of the deletion) which was only detected as deletion by SNP6.0 array (red).



Supplementary Figure S3. Acquisition of copy number alterations in a CLL patient detected by qChip®Hemo array. Genomic profile of case 102 at diagnosis (top image) and at follow-up (bottom). The chromosomes are represented horizontally from 1 to 22, gains and losses are colored in blue and red, respectively. Some of the acquired alterations are indicated by arrows.



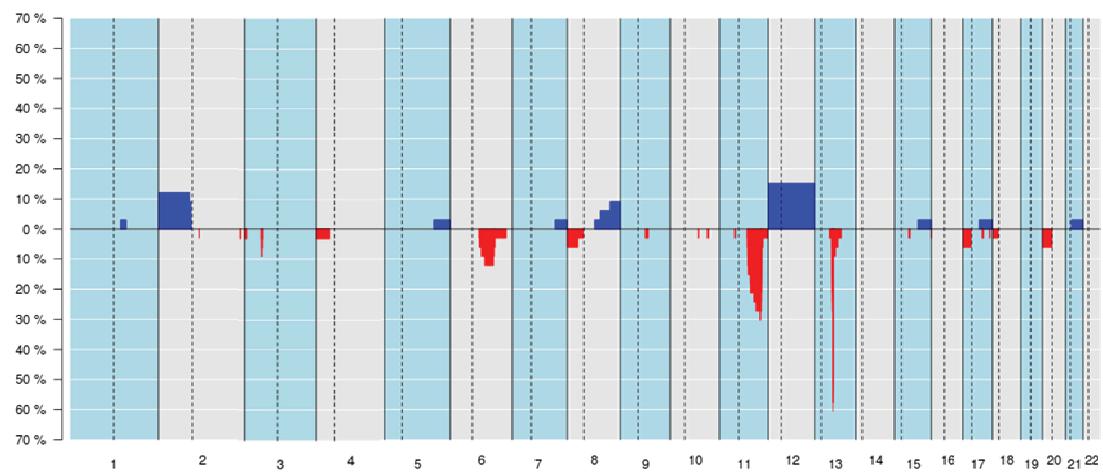
Supplementary Figure S4. Circular representation of copy number and structural variants in 64 CLL patients. Chromosomes are represented in the outer layer, the percentage of regions lost (red; dark red for homozygous deletion) and gained (blue) are shown (outer layer qChip array and inner layer Karyotype). The internal arcs represent interchromosomal translocations detected by conventional cytogenetics and are colored in black. Blue arcs indicate intrachromosomal inversions and green lines indicate additions/insertions.



Supplementary Figure S5. Comparison of genomic profiles of the 34 CLL patients analyzed with the two different arrays. The chromosomes are represented horizontally from 1 to 22 on the X-axis whereas the percentage of cases showing the alterations are on the Y-axis. Gains are colored in blue and losses in red. (A) qChip@Hemo array and (B) SNP6.0 arrays, with exactly the same alterations detected.

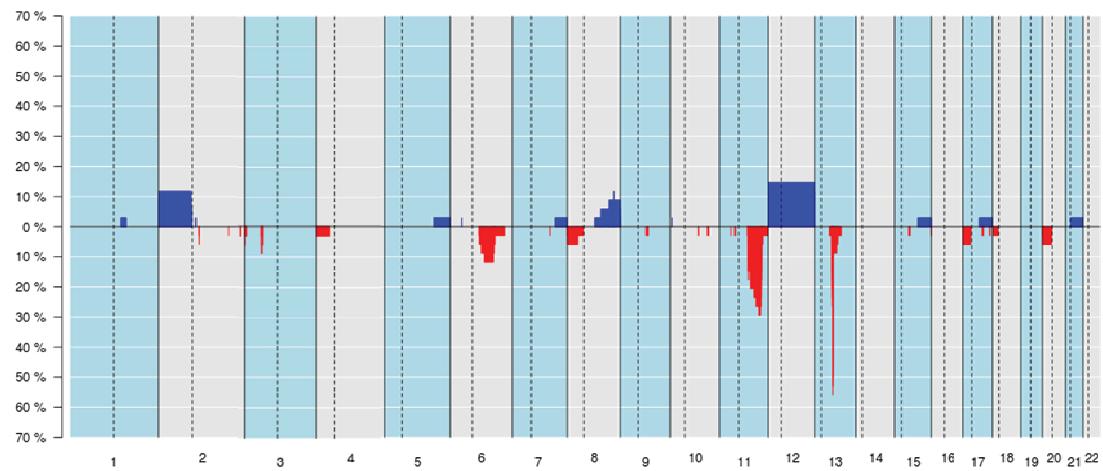
A

qChip®Hemo

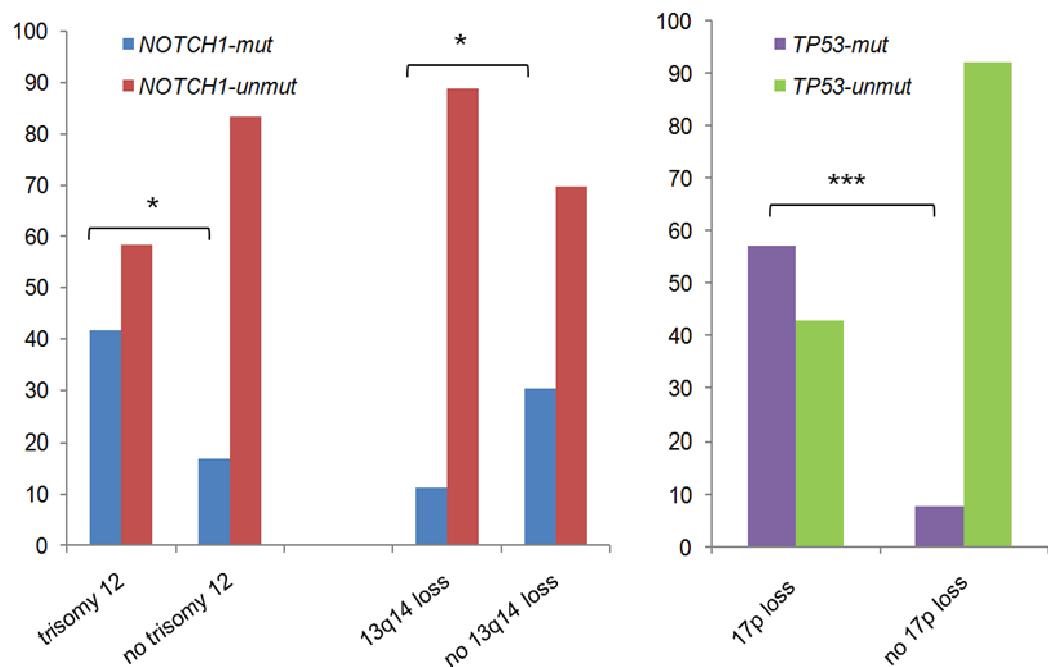


B

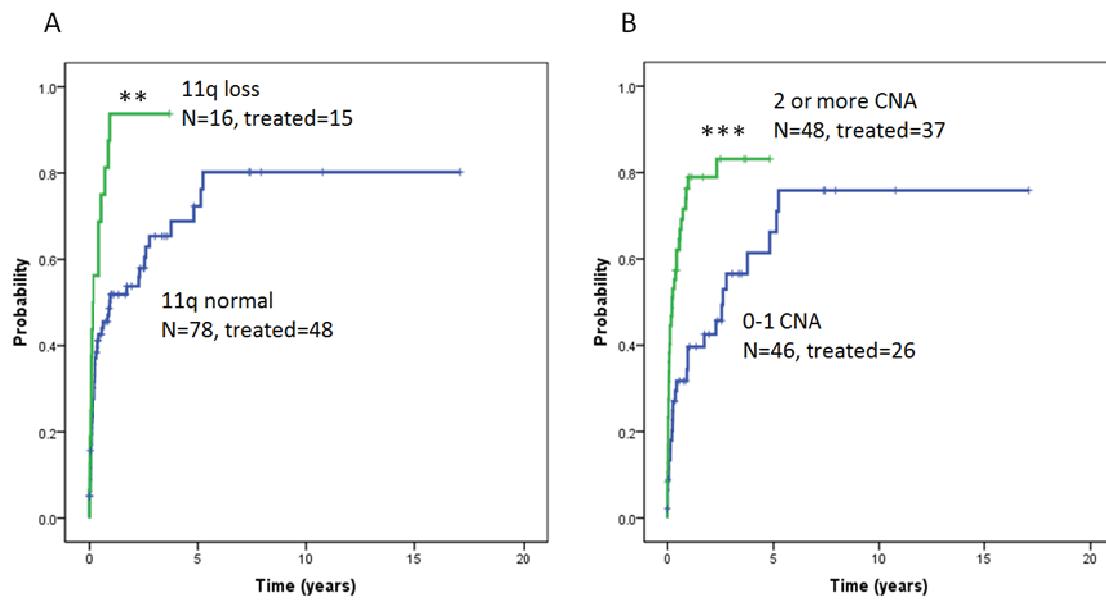
SNP6.0



Supplementary Figure S6. Distribution of trisomy 12 and 13q14 loss in CLL cases with or without *NOTCH1* mutation (left) and distribution of 17p13 loss with or without *TP53* mutation (right) (* $P<0.05$; * $P<0.001$).**

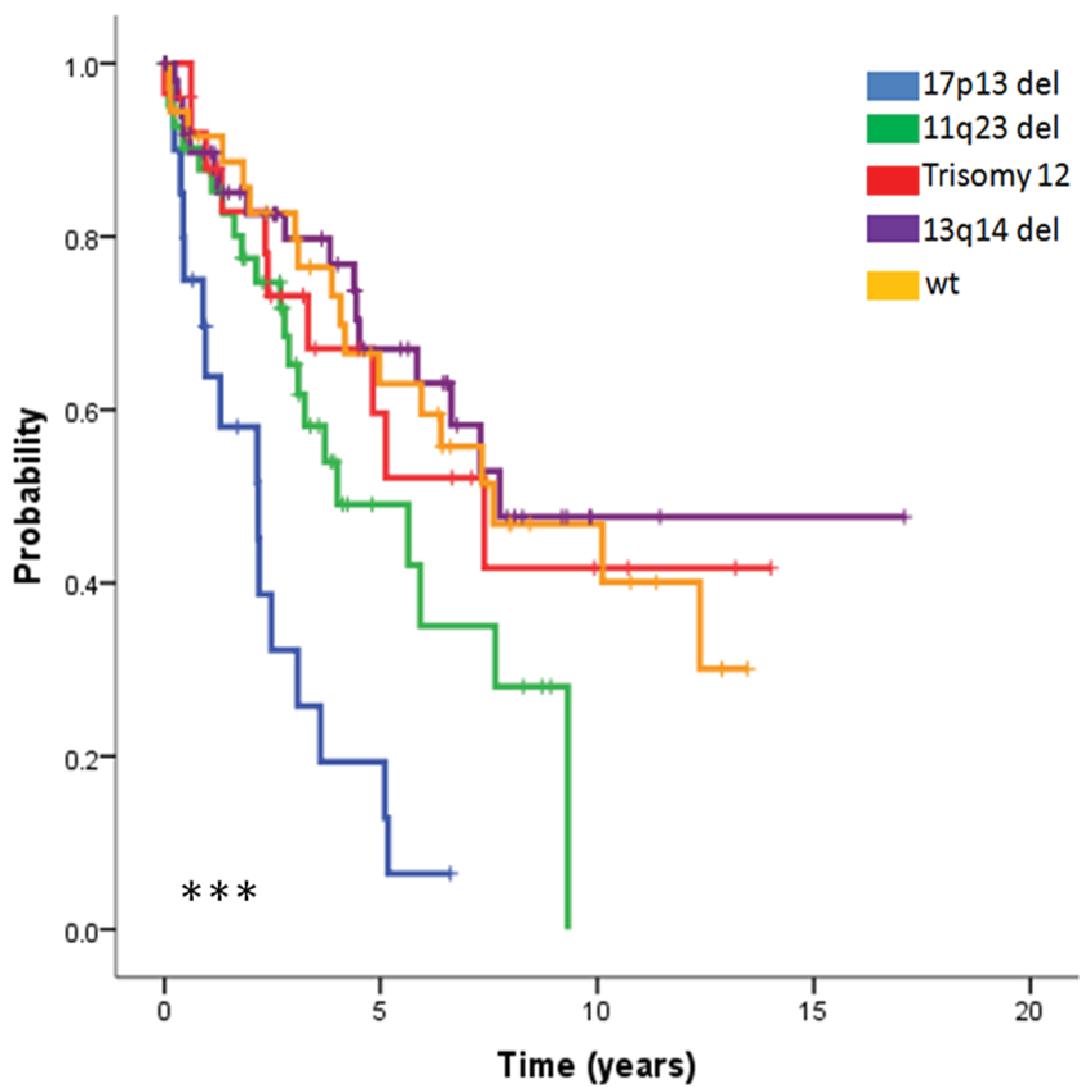


Supplementary Figure S7. Time to first treatment (TTT) analysis of CLL patients using the qChip®Hemo array. Shorter TTT in patients according to **(A)** 11q loss and **(B)** genetic complexity (1 or less versus 2 or more copy number alterations [CNA] per case) (* $P<0.05$; *** $P<0.001$).



Supplementary Figure S8. Overall survival (OS) analysis of CLL patients using the qChip®Hemo array. Döhner model (Dohner et al., 2000) for stratification of patients based on their genetic aberrations detected by FISH applied to qChip®Hemo array data. N, number; D, deceased patients (***($P<0.001$)).

Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, Dohner K, Bentz M, & Lichter P. 2000. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 343: 1910-1916..



Estudi 2

CCND2 and CCND3 hijack immunoglobulin light chain enhancers in cyclin D1-negative mantle cell lymphoma

David Martín-Garcia^{*1,2}, Alba Navarro^{*1,2}, Rafael Valdés-Mas³, Guillem Clot^{1,2}, Jesús Gutiérrez-Abril³, Miriam Prieto^{1,2}, Inmaculada Ribera-Cortada⁴, Renata Woroniecka⁵, Grzegorz Rymkiewicz⁶, Susanne Bens^{7,8}, Laurence de Leval⁹, Andreas Rosenwald¹⁰, Judith A. Ferry¹¹, Eric D. Hsi¹², Kai Fu¹³, Jan Delabie¹⁴, Dennis Weisenburger¹⁵, *Daphne de Jong*¹⁶, *Fina Climent*¹⁷, *Sheila J. O'Connor*¹⁸, Steven H. Swerdlow¹⁹, David Torrents^{20,21}, Sergi Beltran²², Blanca Espinet²³, Blanca González-Farré^{2,24}, Luis Veloza²⁴, Dolors Costa^{2,24}, Estela Matutes²⁴, Reiner Siebert^{7,8}, German Ott²⁵, Leticia Quintanilla-Martinez²⁶, Elaine S. Jaffe²⁷, Carlos López-Otín^{2,3}, Itziar Salaverria^{1,2}, Xose S. Puente^{2,3#}, Elias Campo^{1,2,23,28#}, Sílvia Beà^{1,2#}

¹Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

²Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer (CIBERONC), Madrid, Spain

³Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Instituto Universitario de Oncología, Universidad de Oviedo, Oviedo, Spain

⁴Hospital Nostra Senyora de Meritxell, Escaldes-Engordany, Principat d'Andorra

⁵Cytogenetic Laboratory and ⁶Department of Pathology and Laboratory Diagnostics, Maria Skłodowska-Curie Institute - Oncology Center, Warsaw, Poland

⁷Institute of Human Genetics, Ulm University and Ulm University Medical Center, Ulm, Germany

⁸Institute of Human Genetics, Christian-Albrechts-University Kiel and University Hospital Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Kiel Germany

⁹Institut de Pathologie, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Lausanne, Switzerland

¹⁰Institute of Pathology, University of Würzburg, and Comprehensive Cancer Center Mainfranken, Würzburg, Germany

¹¹Department of Pathology, Massachusetts General Hospital, and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA

¹²Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, OH, USA

¹³Departments of Pathology and Microbiology and Hematology Oncology, University of Nebraska Medical Center, Omaha, NE, USA

¹⁴University of Toronto and Oslo University Hospital, Oslo, Norway

¹⁵Department of Pathology, City of Hope National Medical Center, Duarte, CA, USA

¹⁶VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands

¹⁷Hospital Universitari de Bellvitge-IDIBELL, L'Hospitalet de Llobregat, Spain

¹⁸HMDS Laboratory, Leeds Teaching Hospitals NHS Trust, St James's Institute of Oncology, Leeds, UK

¹⁹Department of Pathology, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA, USA

²⁰Joint BSC-CRG-IRB Research Program in Computational Biology, Barcelona Supercomputing Center, Barcelona, Spain

²¹Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), Barcelona, Spain.

²²Centre Nacional d'Anàlisi Genòmica (CNAG)-Centre for Genomic Regulation (CRG), Barcelona, Spain

²³Laboratori de Citogenètica Molecular, Servei de Patologia, Hospital del Mar, Barcelona, Spain; Grup de Recerca Translacional en Neoplàsies Hematològiques, Cancer Research Programme, IMIM-Hospital del Mar, Barcelona, Spain

²⁴Hematopathology Section, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain

²⁵Department of Clinical Pathology, Robert-Bosch-Krankenhaus, and Dr. Margarete Fischer-Bosch Institute of Clinical Pharmacology, Stuttgart, Germany

²⁶Institute of Pathology, Eberhard-Karls-University of Tübingen, Tübingen, Germany

²⁷Laboratory of Pathology, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, USA

²⁸University of Barcelona, Barcelona, Spain

*these authors have contributed equally.

[#]these authors have contributed equally.

Running head: IGK/L enhancer hijacking in MCL

Scientific category: Lymphoid Neoplasia

Word Count: Abstract: 248, **Main Text:** 3950

Figures: 5, **Tables:** 1, **References:** 55

Suppl. Material: 1 pdf and 1 excel spreadsheet

Send correspondence to:

Sílvia Beà, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Rosselló 149-153, Barcelona, 08036, Spain, Tel: +34-93-2275400 ext. 4792; E-mail: sbea@clinic.cat

KEY POINTS

1. Cryptic insertions of IG light chain enhancers are associated with *CCND2* and *CCND3* overexpression in cyclin D1⁻ mantle cell lymphomas
2. Most cyclin D1⁻ mantle cell lymphomas had *CCND2* or *CCND3* rearrangements whereas a small subset show upregulation of *CCNE1* and *CCNE2*

ABSTRACT

Mantle cell lymphoma (MCL) is characterized by the t(11;14)(q13;q32) translocation resulting in overexpression of cyclin D1. However, a small subset of cyclin D1-negative MCL (cyclin D1⁻ MCL) has been recognized, and approximately half of them harbor *CCND2* translocations while the primary event in cyclin D1⁻/D2⁻ MCL remains elusive. To identify other potential mechanisms driving MCL pathogenesis we investigated 56 cyclin D1⁻/SOX11⁺ MCL by fluorescence *in situ* hybridization (FISH), whole genome/exome sequencing, gene expression and copy number arrays. FISH with break-apart probes identified *CCND2* rearrangements in 39 (70%) cases but not *CCND3* rearrangements. We analyzed 3 of these negative cases by whole-genome/exome sequencing and identified IGK (n=2) and IGL (n=1) enhancer hijackings near *CCND3* that were associated with cyclin D3 overexpression. By specific FISH probes, including the IGK enhancer region, we detected 10 additional cryptic IGK juxtapositions to *CCND3* (6 cases) and *CCND2* (4 cases) in MCL that overexpressed, respectively, these cyclins. A minor subset of 4 cyclin D1⁻ MCL cases lacked cyclin D rearrangements and showed upregulation of *CCNE1* and *CCNE2*. These cases had blastoid morphology, high genomic complexity, and *CDKN2A* and *RB1* deletions. Both genomic and gene expression profiles of cyclin D1⁻ MCL cases were indistinguishable from cyclin D1⁺ MCL. In conclusion, virtually all cyclin D1⁻ MCL carry *CCND2/CCND3* rearrangements with IG genes, including a novel IGK/L enhancer hijacking mechanism. A subset of cyclin D1⁻/D2⁻/D3⁻ MCL with aggressive features have cyclin E dysregulation. Specific FISH probes may allow the molecular identification and diagnosis of cyclin D1⁻ MCL.

INTRODUCTION

Mantle cell lymphoma (MCL) is a mature B-cell malignancy genetically characterized by the primary translocation $t(11;14)(q13;q32)$ found in the vast majority cases.¹⁻³ This translocation juxtaposes the *CCND1* gene to an enhancer of the immunoglobulin heavy chain gene (IGH) leading to constitutive cyclin D1 upregulation. Nevertheless, a small subset of MCL lacks cyclin D1 overexpression and the $t(11;14)$ (cyclin D1⁻ MCL).⁴⁻¹⁰ These cases have similar morphology, phenotype, gene expression profile, genomic alterations, and clinical behavior as conventional cyclin D1⁺ MCL.^{5,11,12} SOX11 is a transcriptional factor constantly overexpressed in most MCL independently of the expression of cyclin D1 and, therefore, it is a useful marker to recognize cyclin D1⁻ MCL cases.¹¹

Interestingly, the first 6 cyclin D1⁻ MCL identified in the *Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project* showed overexpression of cyclin D2 or cyclin D3, but evidence of chromosomal rearrangements affecting these loci was not found by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) using break-apart probes.⁴ However, different reports have detected occasional cyclin D1⁻ MCL cases with high levels of cyclin D2 due to chromosomal translocations with IG genes i.e. $t(2;12)(p11;p13)$ [IGK/CCND2],^{6,8} $t(12;22)(p13;q21)$ [CCND2/IGL],⁷ and a $t(12;14)(p13;q32)$ [CCND2/IGH].⁹ In the largest series of cases analyzed, we identified 55% cases (22/40) with CCND2 rearrangement, preferentially with IG light chains (68%), but CCND3 rearrangement was not identified in the remaining cases using standard break-apart probes.⁵ So far, only one single MCL case with CCND3/IGH rearrangement has been reported.⁸

Overall, the potential role of CCND2 and CCND3 translocations as alternative pathogenic mechanisms to *CCND1* rearrangement in cyclin D1⁻ MCL are not yet fully understood, since not all reports of rearrangements were coupled with expression studies of the rearranged cyclins or with SOX11 expression. In order to clarify the genetic mechanisms behind cyclin D1⁻ MCL we performed an integrative analysis including a complete FISH panel, next-generation sequencing, gene expression, and copy number arrays, in a large series of well characterized cyclin D1⁻ MCL.

METHODS

Patients and samples

A total of 56 cyclin D1⁺ MCL cases (28 partially investigated in previous studies)^{4,5} were included in the current project based on i) morphology and phenotype consistent with MCL (CD5+ and CD23-); ii) absence of cyclin D1 expression and t(11;14)(q13;q32); and iii) SOX11 expression. The main clinicopathological and molecular features of the patients are described in **Table 1**. DNA/RNA extraction was performed from formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) tissue blocks in 52 samples, fresh-frozen material in 7 samples, and Carnoy fixed cells in 2 samples. The study was approved by the Institutional Review Board of the Hospital Clinic of Barcelona.

Cytogenetic analyses

FISH analyses were performed on FFPE tissue sections or fixed cells from cytogenetic cultures. The FISH panel used to interrogate breaks and juxtapositions of the loci CCND2, CCND3, CCNE1, CCNE2, IGH, IGL, and IGK including both commercial and BAC-labeled probes is detailed in **Supplemental Table S1**. The extraction and labeling of BAC and PAC DNA, preparation of slides and hybridization was performed according to standard procedures.¹³ Each clone was first tested individually by hybridization on normal metaphases. Hybridizations were analyzed using standard fluorescence microscopes (Nikon Eclipse 50i or Zeiss) equipped with appropriate filter sets. Acquisition and processing of digital images were performed using the ISIS FISH Imaging System (MetaSystems, Altlussheim, Germany). For the detection of IGK cryptic insertions 2 overlapping BAC clones covering the IGK enhancer region were selected, labeled, and hybridized together with CCND2, CCND3, CCNE1, or CCNE2 specific probes with different fluorochromes. Negative tissue controls for these FISH experiments included 1 reactive lymph node, 4 chronic lymphocytic leukemias (CLL), 6 diffuse large B-cell lymphomas (DLBCL), 1 follicular lymphoma (FL), and 1 splenic marginal zone lymphoma (SMZL). To verify CCNE2 gain we used simultaneously CCNE2 (8q22) and chr8 centromeric probes. Conventional cytogenetics was performed on G-banded chromosomes and results were described according to An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (ISCN).¹⁴

Next-generation sequencing (NGS) analyses

Somatic structural variants (SVs) were analyzed by different NGS approaches in 5 MCL cases: long-insert-size (7-10Kb) paired-end mapping whole-genome sequencing (MP-WGS) of 4 tumors and 10 normal unmatched DNA; paired-end whole-genome sequencing (WGS) of tumor and matched normal sample of 1 patient; and whole-exome sequencing

(WES) in 3 tumors (**Supplemental Figure S1** and **Supplemental Table S2**).^{15,16} Libraries were constructed according to standard protocols (Illumina) and sequencing was performed with an Illumina HiSeq 2000 instrument.¹⁵ Reads were mapped to hg19 human reference genome using the Burrows-Wheeler Aligner (BWA-MEM version 0.7.5a-r405). PCR duplicates were removed using MarkDuplicates algorithm from Picard tools. SVs were analyzed using different pipelines: i) BWA with the "samse" option was used for MP-WGS analysis in combination with custom scripts to detect interchromosomal translocations supported by at least four reads, followed by visual inspection (ID3, ID6, ID73, and ID76); ii) Smufin¹⁷ and Lumpy¹⁸ were used to detect SVs in the WGS of case ID73; and iii) custom scripts were used to analyze/confirm potential interchromosomal SVs in the WES data (ID3, ID5 and ID6). We excluded SVs in repetitive or ambiguously aligned regions in the MP-WGS analysis. Due to the lack of germline DNA for most samples, SVs present both in 2 or more of the 4 MP-WGS and 1 or more of 10 normal samples or present in dbVar were removed as potential germline variants/artifacts. In case ID73, copy number alterations (CNA) from WGS were analyzed using FREEC¹⁹ and ASCAT algorithms, whereas single nucleotide variants (SNV) and indels were analyzed using 3 different pipelines: Smufin,¹⁷ Sidrón,²⁰ and Mutect2,²¹ and annotated by Annovar. Verification of breakpoints (**Supplemental Table S3**) and mutations was performed by Sanger sequencing.

Gene expression and copy number analyses

Total RNA from 14 cyclin D1⁻ MCL and 7 cyclin D1⁺ MCL was extracted from FFPE tissue biopsies, processed using SensationPlus™ FFPE Amplification and 3' IVT Labelling Kit, and hybridized on GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Arrays were washed and stained using GeneChip Fluidics Station 450 (Thermo Fisher Scientific) and GeneChip Scanner. Limma²² was used to detect differentially expressed probesets and *P*-values were adjusted by the Benjamini-Hochberg method. In 38 cyclin D1⁻ MCL, 4 CLL, and 16 normal samples gene expression levels of *CCND2*, *CCND3*, *CCNE1*, and *CCNE2* were investigated by quantitative PCR (qPCR) as previously described,⁵ using *GUSB* as endogenous control and Universal Human Reference RNA as a calibrator (**Supplemental Tables S2 and S4**). qPCR for *CCNE1* and *CCNE2* was also analyzed in 3 blastoid MCL, 6 DLBCL and 7 SMZL. Cyclin E1 protein expression was analyzed by immunohistochemistry (Santa Cruz Biotechnology, antibody clone sc-247, dilution 1:100) in 12 cyclin D1⁻ MCL, 1 CLL, 2 SMZL, and in control tissues (testis as positive control and tonsil and reactive lymph node as negative controls). CNA were evaluated in 42 cyclin D1⁻ cases (47 samples) with different approaches including: CGH-array Agilent 1M (Agilent, Santa Clara, CA), and SNP-arrays 500K, SNP6.0, or Oncoscan CNV (Thermo Fisher Scientific) (**Supplemental Table S2**). CNA analysis was

performed using Nexus Biodescovery version 9.0 software (Biodescovery, Hawthorne, CA, USA) as previously described.^{5,16} All cases were visually inspected by at least two independent observers.

RESULTS

Identification of cryptic rearrangements of IGK and IGL enhancer regions and cyclin D genes in cyclin D1⁻ MCL

To understand the molecular alterations present in cyclin D1⁻ MCL cases, we initially performed FISH analysis using *CCND2*, *IGH*, *IGK*, and *IGL* break-apart probes in 56 cyclin D1⁻ MCL and identified 39 (70%) cases with *CCND2* rearrangements (cyclin D2⁺ MCL), preferentially involving light chains *IGK* (55%) and *IGL* (13%) (**Supplemental Figure S1**). The remaining 17 patients (30%) without *CCND2* rearrangements were analyzed using a *CCND3* break-apart FISH probe but none of them showed rearrangements. Detailed FISH results of all cases are listed in **Supplemental Table S5**.

To investigate the presence of potential rearrangements that might have been undetectable by standard FISH approaches we performed MP-WGS in 2 cases that were negative for FISH rearrangements of *CCND2* and *CCND3* (ID3 and ID6). We detected several somatic interchromosomal SVs (4 in ID3 and 6 in ID6) (**Figure 1A** and **Supplemental Table S6**). Strikingly, both cases showed a similar rearrangement involving *IGK* in chromosome 2 and *CCND3* in chromosome 6, which consisted of a small insertion (26.6 Kb for ID3 and 27.3 Kb for ID6) including the *IGK* enhancer. Virtually the entire *IGK* enhancer (26.4 Kb), as defined by chromatin states in normal mature B-cells,²³ was integrated upstream of the *CCND3* gene (8.4 kb upstream in case ID6 and 65 kb in case ID3). The allelic fraction of the alterations was ~41-44%, suggesting that they were present in virtually all tumor cells. We confirmed these cryptic insertions by Sanger sequencing in both cases and we could identify the breakpoint at single nucleotide resolution (**Figure 1B**). This insertion was also observed by WES in case ID6. In addition, we validated these findings by FISH in case ID3 using a new combination of fusion probes, 1 covering the *CCND3* gene and the other including the enhancer of *IGK* (*IGK*-enh) (**Figure 1C**). Additionally, WES analysis of case ID5 (also negative for FISH with *CCND3* break-apart probe) revealed a similar cryptic insertion of the *IGL* enhancer region in chromosome 22 near the 3' of *CCND3* gene, which was further verified by Sanger sequencing (**Figure 1B**). Interestingly, those 3 cases (ID3, ID5, and ID6) in which we identified the cryptic *IGK/L* enhancer and *CCND3* rearrangement (enhancer hijacking) were initially reported to have cyclin D3 overexpression by microarray expression analysis,⁴ highlighting the functional impact of the cryptic rearrangement at mRNA level, and the potential utility of cyclin D2/D3 expression to help to identify these tumors with cryptic rearrangements in the absence of conventional translocation of the cyclins.

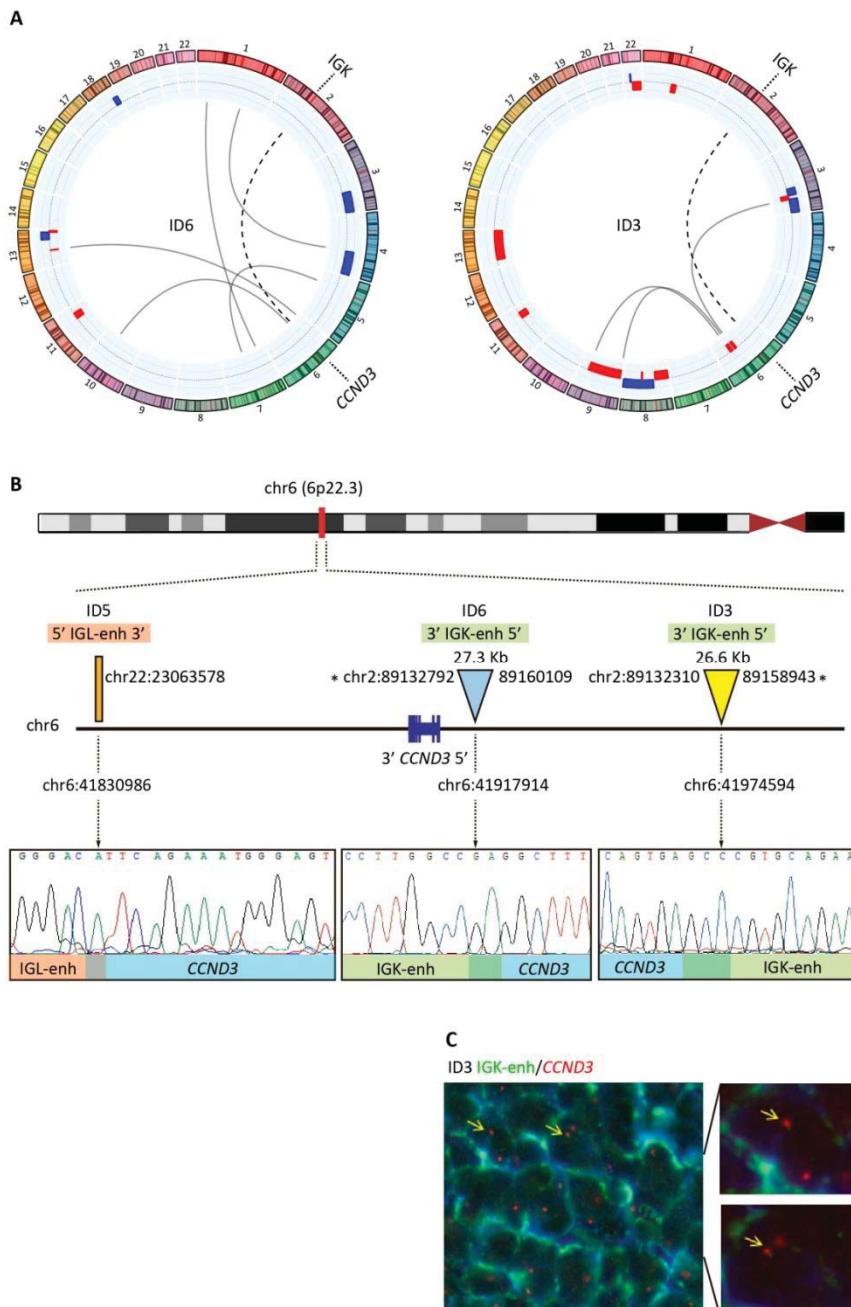


Figure 1. Cryptic insertions of IG light chain enhancer regions near CCND3 gene in 3 cyclin D1⁺ MCL. (A) Circos plots with interchromosomal SVs detected by MP-WGS (black lines) and CNA detected by copy number arrays (blue for gains and red for losses) in cases ID6 and ID3. The rearrangement between chr2 (IGK-enh) and chr6 (CCND3) in both cases is indicated with a discontinuous line. **(B)** Schematic representation of the 6p region around CCND3 locus showing the location of the cryptic insertion of the IGK enhancer (chr2) close to the 5' of CCND3 gene in cases ID6 and ID3 (the length of the inserted fragments is indicated), and the location of the cryptic insertion of IGL enhancer (chr22) near the 3' of CCND3 gene in case ID5. The breakpoints were detected by MP-WGS (cases ID3 and ID6), and whole-exome sequencing (case ID5), and further verified and refined to base pair resolution by Sanger sequencing in the 3 cases. There were 1, 2, and 3 base pair homology at the breakpoint junctions, respectively. **(C)** Verification of the cryptic IGK/CCND3 insertion by FISH in case ID3 using the fusion probe IGK-enh (labeled in green) with CCND3 (labeled in red). FISH analysis shows 2 red and 2 green signals in normal cells and the yellow arrows highlight cells with one red and one small green signal juxtaposed, indicating the presence of the IGK insertion. Magnifications of cells with the rearrangement were shown at the right side. (enh: enhancer). *Breakpoints estimated from MP-WGS data.

In addition, we performed MP-WGS of case ID76, positive for the IGK/CCND2 rearrangement by FISH and also by karyotype. We detected 23 interchromosomal SVs, including 2 which confirmed the IGK/CCND2 reciprocal translocation. Interestingly, the MP-WGS coupled with SNP6.0 array data allowed to refine several alterations of the karyotype (**Figure 2** and **Supplemental Table S6**).

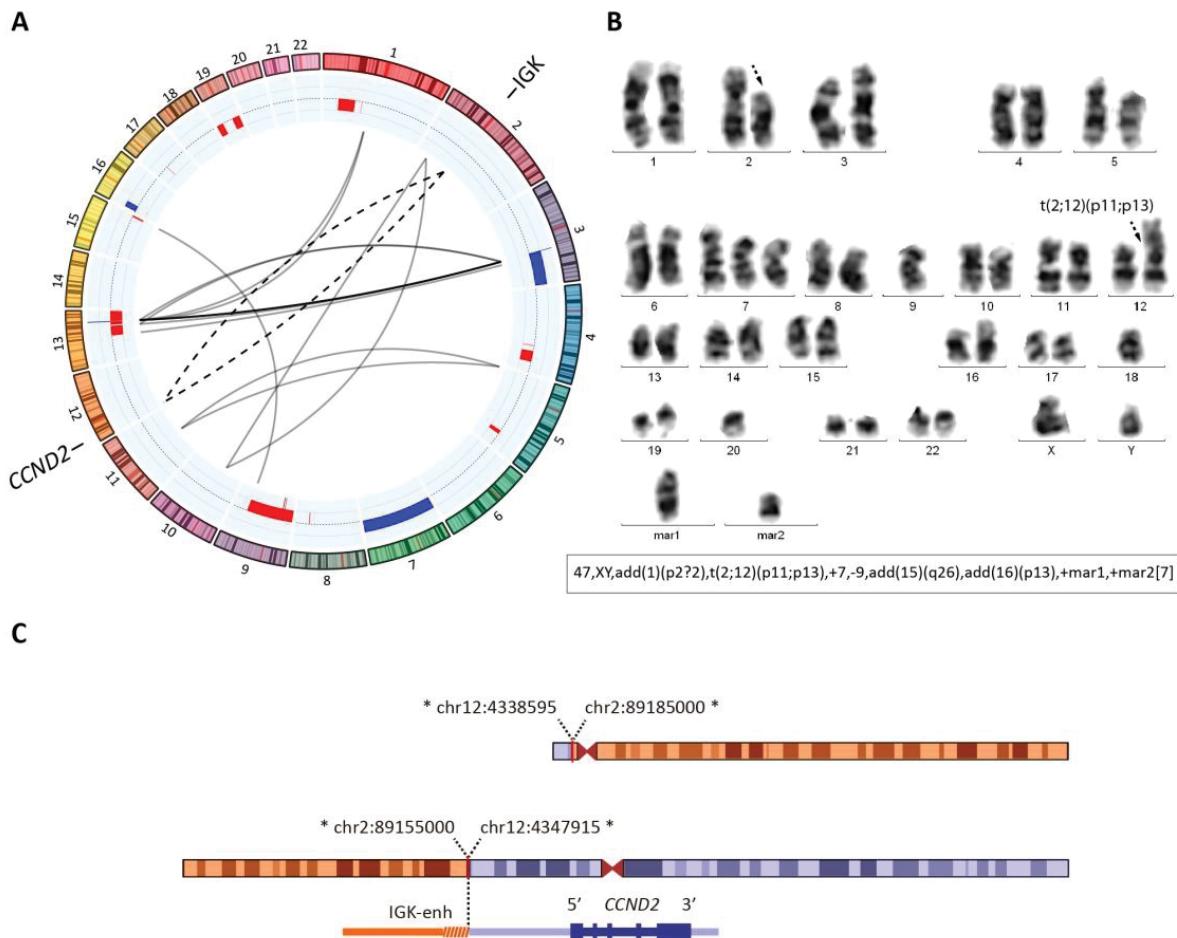


Figure 2. Conventional CCND2 rearrangement in a cyclin D2⁺ MCL. (A) Circos plot with interchromosomal SVs detected by MP-WGS (black lines) and CNA detected by copy number arrays (blue for gains and red for losses) in case ID76. The conventional IGK/CCND2 reciprocal translocation is indicated with two discontinuous lines for both derivative chromosomes. Among other SV, 12 clustered rearrangements were found between chromosomes 3 and 13 (at both regions of high copy gain). (B) A representative metaphase and the karyotype with the IGK/CCND2 rearrangement (black discontinuous arrows) and other numerical and structural aberrations concordant with the results of MP-WGS and copy-number array: trisomy 7; loss of chromosome 9; and 2 marker chromosomes consistent with some of the rearranged chromosomes. (C) Schematic representation of the derivative chromosomes resulting from the translocation and zoomed image of CCND2 locus. *All breakpoints were estimated from MP-WGS analysis (chr2 in orange, containing the IGK enhancer and chr12 in blue containing the CCND2 gene).

Identification of additional cryptic IGK/CCND3 and IGK/CCND2 by FISH

The finding of this enhancer hijacking phenomenon in cyclin D1⁻ MCL associated with CCND3 overexpression prompted us to explore the expression of all cyclins of the G1 phase of cell cycle (CCND2, CCND3, CCNE1, and CCNE2) in cyclin D1⁻ MCL, CLL, and non-neoplastic samples (reactive lymph nodes and tonsils) by qPCR. As expected, all CCND2-rearranged cases tested (n=24) (cyclin D2⁺ MCL) showed elevated levels of CCND2 (median CCND2 expression=127.5) compared to non-rearranged CCND2 MCL cases (median 7.0)(P<.001) (**Figure 3**). Interestingly, among the 14 cases tested without CCND2 or CCND3 rearrangements, 6 cases overexpressed CCND3 (median 18.9), 4 cases overexpressed CCND2 (median 66.2), and the remaining 4 cases overexpressed concomitantly CCNE1 along with CCNE2 (median 7.6 and 3.8, respectively) (**Table 1**, **Figure 3**, and **Supplemental Figure S1**).

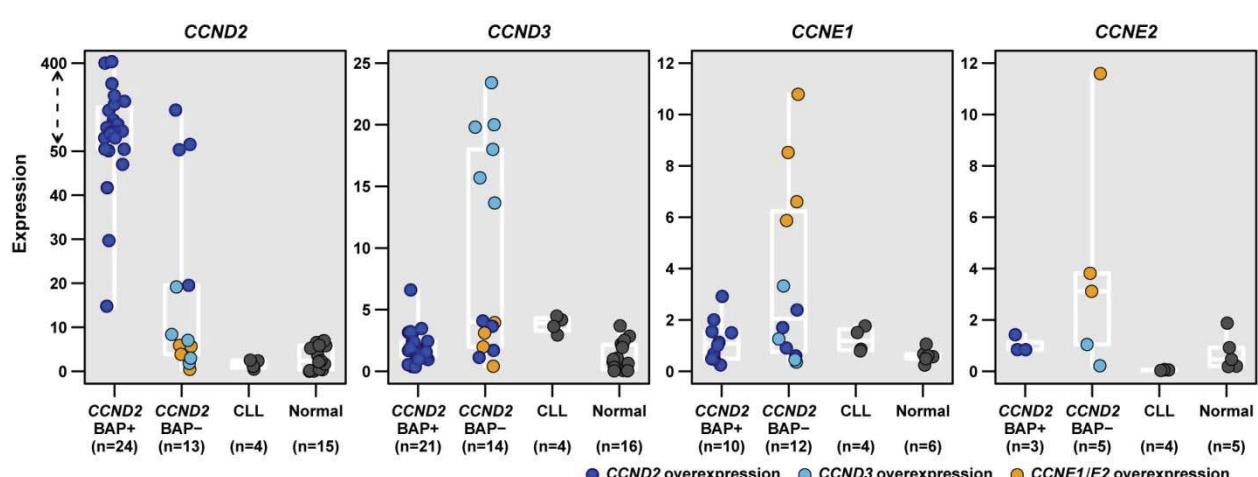


Figure 3. Expression of G1 phase cyclins by quantitative PCR. The expression of CCND2, CCND3, CCNE1, and CCNE2 was represented according to 4 categories: MCL positive or negative for the CCND2 break-apart FISH test (CCND2 BAP+ and CCND2 BAP-, respectively), chronic lymphocytic leukemia (CLL), and non-neoplastic lymphoid samples. Colored dots highlight cases with overexpression of CCND2 (dark blue), CCND3 (light blue), CCNE1 and CCNE2 (both in orange). The overexpression cut-off values were calculated as the mean plus 3 standard deviations in non-rearranged cases: 15.1 for CCND2, 6.2 for CCND3, 3 for CCNE1, and 2.4 for CCNE2. The y-axis of the CCND2 graph has been transformed for the expression values above 50 (dashed arrow).

Given the high levels of CCND3 in these additional 6 cyclin D1⁻ MCL cases, we explored the presence of similar cryptic IGK and CCND3 juxtapositions by FISH using the IGK-enh and CCND3 fusion probe. We detected fusion IGK/CCND3 signals in all 6 cases (**Supplemental Figure S2A** and **Supplemental Table S5**), but not in any of the 9 control samples tested. The presence of these cryptic IG insertions near CCND3 gene leading to

CCND3 overexpression prompted us to hypothesize that the remaining 4 cases with high levels of *CCND2* expression (and negative for *CCND2* breaks using break-apart FISH probes) could present similar cryptic aberrations. Thus, we performed FISH using IGK-enh and *CCND2* probes and we could detect the juxtaposition of both signals in all 4 cases (**Supplemental Figure S2B-C** and **Supplemental Table S5**), but not in the 9 controls tested. Together, these data show that 13 out of the 17 (76%) MCL negative for *CCND2/D3* rearrangements using break-apart probes had IGK/L-enhancer hijacking into either *CCND3* (9 cases) or *CCND2* (4 cases).

Table 1. Clinicopathological and molecular features of the 56 cyclin D1⁻ MCL.

Parameter	Total n=56 (%)	cyclin D2 ⁺ n=43 (%)	cyclin D3 ⁺ n=9 (%)	cyclin E ⁺ n=4 (%)	P- value
Median age (years)	65	66	60	75	0.161
Ratio male/female	2.4/1	3.2/1	2/1	0/1	0.029*
Growth pattern					1
Nodular and/or diffuse	50/52 (96%)	40/42 (95%)	6/6 (100%)	4/4 (100%)	
Mantle zone	2/52 (4%)	2/42 (5%)	0/6 (0%)	0/4 (0%)	
Morphology					0.029*
Classical	43 (81%)	34/40 (85%)	8/9 (89%)	1/4 (25%)	
Blastoid	10 (19%)	6/40 (15%)	1/9 (11%)	3/4 (75%)	
Expression					
SOX11 positive	56 (100%)	43/43 (100%)	9/9 (100%)	4/4 (100%)	1
CD5 positive	54/55 (98%)	43/43 (100%)	7/8 (88%)	4/4 (100%)	0.218
CD23 negative	47/47 (100%)	36/36 (100%)	7/7 (100%)	4/4 (100%)	1
CD10 negative	39/39 (100%)	31/31 (100%)	4/4 (100%)	4/4 (100%)	1
Ig λ light chain restriction	20/25 (80%)	15/19 (79%)	3/3 (100%)	2/3 (67%)	1
Ki67 (≥30%)	24/42 (57%)	18/33 (55%)	2/5 (40%)	4/4 (100%)	0.153
Median expression (qPCR)					
<i>CCND2</i>	17.0	124.8	7.0	4.8	<0.001
<i>CCND3</i>	2.0	1.8	18.9	2.6	<0.001
<i>CCNE1</i>	1.0	1.1	0.9	7.6	0.009
<i>CCNE2</i>	0.8	0.8	0.6	3.8	0.077
Molecular					
Median CNA/case	10	9	9	17	0.098
Chromothripsis	10/42 (24%)	6/29 (21%)	3/9 (33%)	1/4 (25%)	0.847
-17p13/ <i>TP53</i>	8/42 (19%)	8/29 (28%)	0/9 (0%)	0/4 (0%)	0.144
-11q22/ <i>ATM</i>	14/42 (33%)	9/29 (31%)	5/9 (55%)	0/4 (0%)	0.140
-9p21/ <i>CDKN2A</i>	20/42 (48%)	14/29 (48%)	2/9 (22%)	4/4 (100%)	0.033*
-13q14/ <i>RB1</i>	17/42 (40%)	9/29 (31%)	4/9 (44%)	4/4 (100%)	0.030*
+18q	15/42 (36%)	8/29 (28%)	3/9 (33%)	4/4 (100%)	0.025*
+3q	23/42 (55%)	18/29 (62%)	3/9 (33%)	2/4 (50%)	0.378
-1p	16/42 (38%)	10/29 (34%)	6/9 (67%)	0/4 (0%)	0.049*
Clinical data					
Treated at diagnosis [#]	38/41 (93%)	27/29 (93%)	7/8 (88%)	4/4 (100%)	0.589
High-dose therapy (%)	2/41 (5%)	2/29 (7%)	-	-	
Immunotherapy (%)	25/41 (61%)	18/29 (62%)	3/8 (38%)	4/4 (100%)	
Other (%)	11/41 (27%)	7/29 (24%)	4/8 (50%)	-	
Observation (%)	3/41 (7%)	2/29 (7%)	1/8 (13%)	-	
3-yr overall survival (95 CI%)	68% (54-86)	59% (42-83)	100% (100-100)	75% (43-100)	0.424

CI: confidence interval; CNA: copy number alterations; IHC: immunohistochemistry; qPCR: quantitative PCR.

*P-values below 0.05 were considered significant. P-values were calculated using the Fisher's exact and Kruskal-Wallis tests for categorical or continuous variables between the 3 groups, respectively.

[#]High-dose therapy includes Cytarabine-based immunotherapy; Immunotherapy includes R-CHOP and R-CHOP-like regimens; and Other includes low-dose therapy (alkylating agents alone or in combination) and radiotherapy.

Absence of detectable primary genetic events in a small subset of cyclin D1⁺ MCL

After the identification of the cryptic IGK enhancer rearrangements with *CCND3* and *CCND2* in MCL negative for the *CCND2/D3* break-apart by FISH, only 4 of the 56 cyclin D1⁺ MCL remained without an identified primary genetic event. All 4 cases overexpressed concomitantly *CCNE1* and *CCNE2* mRNA but not the remaining cyclin D genes. We performed cyclin E1 immunohistochemistry and the 3 cases tested (ID26, ID73, and ID77) were strongly positive in most of the cells (>65%) (**Figure 4A**) as compared to only 1 out of 9 cyclin D2⁺ or cyclin D3⁺ MCL, 1 out of 3 B-cell lymphomas (a SMZL sample), and none of the 2 non-malignant lymphoid tissues tested. These findings confirmed the cyclin E1 overexpression also at protein level in these cases. We also compared the *CCNE1/E2* mRNA expression in 3 cyclin D1⁺ blastoid MCL, 6 DLBCL and 7 SMZL. *CCNE1/E2* levels were high in the 4 cyclin E⁺ MCL but negative or undetectable in the other cases (**Supplemental Figure S3**). To determine whether the *CCNE* overexpression could be due to a genomic rearrangement, we performed FISH using a *CCNE1* break-apart probe and the IGK enhancer with *CCNE1* or *CCNE2* probes in 3 cases but all were negative. Furthermore, these cases showed no evidence of IGK, IGL, and IGH rearrangement by FISH (**Supplemental Table S5**).

We then performed MP-WGS (tumor) and WGS (tumor and normal) of the remaining case with *CCNE1/E2* overexpression (case ID73) (**Figure 4B** and **Supplemental Table S7**). We could not find any genetic rearrangement involving IG, cyclin D or cyclin E genes. Of note, we detected a 8q21.2-q23 high-level gain (around 6 copies estimated by WGS) which included the *CCNE2* locus and was confirmed by FISH (**Figure 4C-D**), and 2 homozygous deletions, one truncating *RB1* at 13q14 and one affecting *CDKN2A* at 9p21. We also detected 32 intrachromosomal and 35 interchromosomal rearrangements, 12 of them only detected by MP-WGS. Finally, we analyzed the genes truncated by SVs and found disruption of 50 genes, including cancer-associated genes such as *NBN*, *BCL2L11 (BIM)*, and *ARID1B* among others. We detected 31 somatic protein-coding mutations by WGS analysis, none of them previously reported in MCL samples (**Figure 4B** and **Supplemental Table S8**).^{16,24}

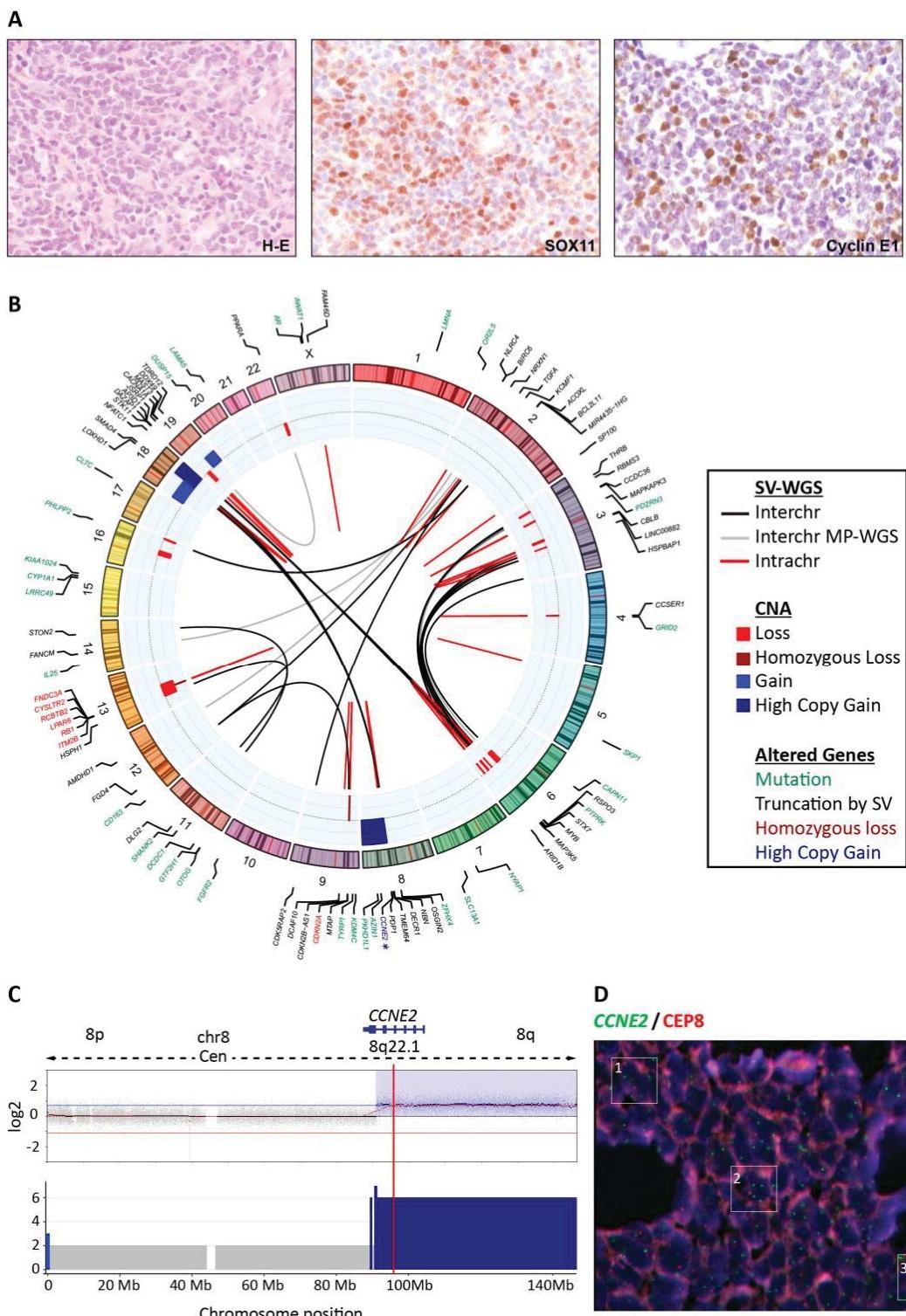


Figure 4. Comprehensive genetic characterization of a MCL negative for CCND1, CCND2, and CCND3 (ID73). (A) Tumor cells from the skin lesion had a blastoid morphology (Hematoxilin & Eosin; 40x), nuclear positivity for SOX11 (40x), and cyclin E1 (40x). (B) Circos plot representing from inner to outer circles: SVs detected by WGS (black lines for interchromosomal and red for intrachromosomal rearrangements) or detected only by MP-WGS (grey lines), CNA are represented in blue (gains and high copy gains) and red (losses and homozygous losses) palettes. In the outer circle the genes altered by mutations (green), genes disrupted by SVs (black), genes affected by homozygous deletions (red), and CCNE2 gene with high-level gain (dark blue). No rearrangements of any cyclin or immunoglulin genes could be detected. There were 2 dense clusters of

interchromosomal rearrangements: i) one between chromosomes 3 and 6, at the regions of copy number loss; and ii) between chromosomes 8 and 18 at the regions of high copy gain. The gain of chromosome 19 and the loss of chromosome 22 were also supported as a reciprocal rearrangement by MP-WGS. The tumor purity of the case inferred by ASCAT was 78.2% and the ploidy 2.13 (diploid). (**C**) Chromosome 8 profile showing a partial 8q high-level gain (including the *CCNE2* gene locus, indicated by the red line) by two different techniques; SNP6.0 copy number arrays (top) and WGS analysis (bottom). (**D**) FISH with a locus specific *CCNE2* probe (green) and a centromeric chromosome 8 probe (orange) confirming that most tumors cells had at least 2 extra copies of *CCNE2* gene

Global expression, genomic profiles, and overall survival in cyclin D1⁻ MCL

We compared the global gene expression profile of 14 cyclin D1⁻ MCL and 7 cyclin D1⁺ MCL. The unsupervised clustering analysis did not segregate these cases into different clusters. Moreover, principal component analysis showed that the main source of variability (45%) was not related to the absence of cyclin D1 expression. *CCND1* was the only significant differentially expressed gene (adjusted $P=2.3\times 10^{-11}$), and besides overexpression of *CCND2* (10 cases), *CCND3* (one case), or concomitant *CCNE1/CCNE2* (2 cases), no other overexpressed genes were found (**Supplemental Figure S4**).

We compared the global profile of CNA of 42 cyclin D1⁻ MCL with 116 previously published cyclin D1^{+/SOX11⁺ MCL^{12,16,25 and the profiles were indistinguishable. Similar to cyclin D1⁺ MCL, cyclin D1⁻ MCL had a high complex profile (median 10 CNA/case), frequent deletions of 9p21/*CDKN2A* (48%), 11q22/*ATM* (33%), and 17p13/*TP53* (19%) (**Table 1**, **Figure 5**, and **Supplemental Figure S5A**, and **Supplemental Table S9**). No statistical differences were found between cyclin D2⁺ (n=29) vs cyclin D3⁺ (n=9) MCL subgroups (**Supplemental Figure S5B**). Interestingly, all 4 cases with *CCNE1/E2* overexpression showed alterations in cell cycle and apoptosis related-genes, such as focal homozygous deletions of 9p21 (*CDKN2A*), 13q14 deletions (*RB1*), and large high-copy gains of 18q (*BCL2*). These 4 cases also had a higher number of CNA (median 17 CNA/case) than cyclin D2⁺ or cyclin D3⁺ MCL (median 9 CNA/case) (**Table 1**). We also analyzed the CNA of 2 different tumor samples of the same patient in 5 cases (1 synchronous and 4 sequential) and they showed both common and unique alterations, suggesting the presence of genetically heterogeneous subpopulations and clonal evolution in each case (**Supplemental Figure S5C**).}}

The cyclin D1⁻ MCL patients had a similar overall survival (OS) than cyclin D1^{+/SOX11⁺ MCL (**Supplemental Figure S6A**).²⁶ Noteworthy, although the 3-year OS was higher in patients with cyclin D3⁺ than patients with cyclin D2⁺ or cyclin E⁺ (100%, 59% and 75%, respectively), these differences were not statistically significant (**Table 1** and **Supplemental Figure S6B**).}

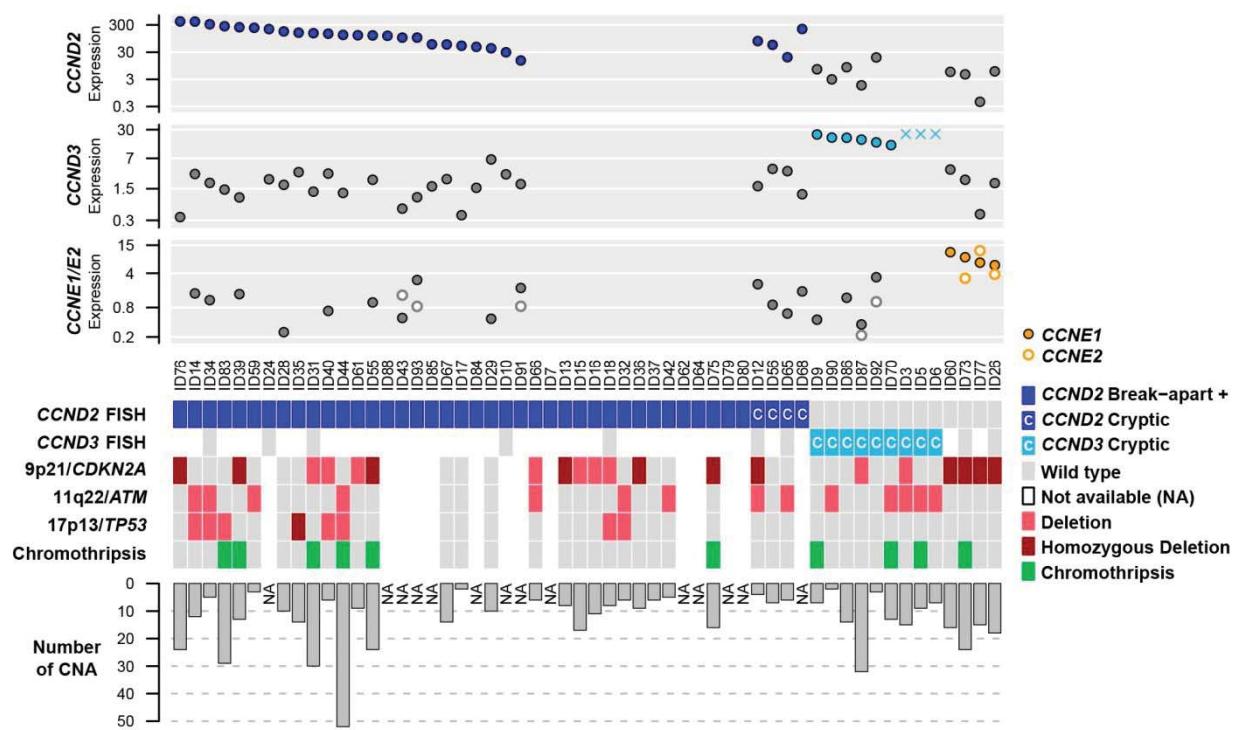


Figure 5. Global genetic landscape of the 56 cyclin D1⁺ MCL. Each MCL case is represented in a column and several specific molecular analysis in different rows. From top to bottom: 3 plots showing cyclin expression levels detected by qPCR (and by gene expression arrays in 3 cases, indicated with "X"); FISH results using break-apart or specific IGK-enh and *CCND2* or *CCND3* probes to detect cryptic rearrangements (rearranged cases in dark and light blue, respectively, and cryptic rearrangements are indicated with "C"); deletions of 9p21, 11q22, and 17p13 by copy number arrays (deletion in red, homozygous deletion in bordeaux); and presence of chromothripsis (green). The bar graph indicates the number of CNA detected in each case (NA, not available).

DISCUSSION

MCL is a well characterized lymphoid neoplasm with the t(11;14) leading to cyclin D1 overexpression as the primary genetic event. However, a particular subset of cases with the same histology and phenotype but lacking cyclin D1 expression has been recognized.¹ We previously reported chromosomal translocations of CCND2 locus with IG genes in approximately half of these cases and emphasized the value of this approach for the recognition of a proportion of cyclin D1⁻ MCL.⁵ Nevertheless, the primary rearrangement in the remaining cases could not be established. We document here a deep comprehensive analysis of the largest series of cyclin D1⁻ MCL cases ever reported, integrating molecular and genetic data with NGS technologies, which allowed us to unveil for the first time selective cryptic insertions of IGK/L enhancer regions (enhancer hijacking) into cyclin D genes in the majority of the cases that lacked a CCND2 conventional rearrangement.

Our integrative study found that 16% of cyclin D1⁻ MCL had CCND3 rearrangements, all of them consisting of a cryptic insertion of the IGK/L enhancer that was associated with CCND3 overexpression and may be considered an alternative molecular mechanism to CCND1 or CCND2 primary translocations. Interestingly, a CCND3/IGH translocation has been previously reported in one MCL,⁸ one low grade B-cell lymphoma, 3 splenic lymphomas, and 7 aggressive B-cell lymphomas.²⁷⁻³⁰ Notably, in all these cases the CCND3 rearrangement was with IGH and detectable by conventional cytogenetics. Intriguingly, some of these cases expressed CD5, had blastoid morphology and unmutated-IGHV with splenic and leukemic involvement. Although SOX11 expression was not studied, these features suggest that at least some of these cases could correspond to MCL. In multiple myeloma, 15-25% cases have CCND1/IGH rearrangement or CCND1 gain/amplification coupled with CCND1 overexpression, 3-5% have CCND3/IGH rearrangement associated with CCND3 overexpression, whereas CCND2 overexpression has been detected in a subset of 5% cases without apparent genomic alterations.^{31,32} Interestingly, no CCND3 rearrangement with IGK has been previously detected in human lymphomas, but the application of RNA-seq analyses of a canine DLBCL showed the presence of an IGK/CCND3 rearrangement associated with overexpression of CCND3.³³

In our series a large proportion of cyclin D1⁻ MCL had conventional CCND2 rearrangements (70%), a higher frequency than previously reported (55%).⁵ We have now identified an additional subset of 7% cases with cryptic IGK/CCND2. Interestingly, CCND2 is preferentially rearranged with IG light chains genes instead of IGH, being IGK more frequent than IGL (83% and 17%). Similarly, 8 CCND3 rearrangements were with IGK, only 1 with IGL, and none with IGH. Of note, both CCND2 and CCND3 chromosomal breaks occur in a

large region (including the 5' or 3' of *CCND3*) whereas the IGK breaks occur in a restricted region which contained the enhancer element.

One of the most remarkable findings in our study was the restricted small insertion of the IGK/L enhancer close to the *CCND2/D3* genes associated with their respective overexpression, a finding not previously detected in lymphoid neoplasms. We could resolve the breakpoints at single nucleotide resolution identifying 1-3 identical nucleotides on both sides of the breakpoints. These special enhancer rearrangements seem to parallel the mechanism of enhancer hijacking activating known oncogenes recently identified in solid tumors and some lymphoid neoplasms. In solid tumors, recurrent SVs bring together a distal active enhancer to an oncogene promoting its expression. This mechanism has been identified for *MYC* and *MYCN* in high-risk pediatric neuroblastoma,³⁴ *TERT* in neuroblastoma,³⁵ *PRDM6*,³⁶ *GFI1*, *GFI1B* and *DDX31*^{37,38} in medulloblastoma, and *IGF2* in colorectal cancer.³⁹ *MYC* rearrangements with super-enhancers from non-IG genes (i.e. *NSMCE2*, *TXNDC5*, *FAM46C*, *FOXO3*, *PRDM1*) have been frequently found in multiple myeloma.⁴⁰ In addition to translocations, lymphoid neoplasms may have other small-scale SVs involving active enhancers such as amplifications of enhancer regions close to oncogenes or selective deletions and inversions that reposition candidate enhancer elements in the vicinity of oncogenes.^{41,42} All these findings emphasize that SVs targeting active enhancer regions may be a mechanism of activating oncogenes more prevalent than initially thought and present across different cancer types. It would be interesting to explore whether the “IG enhancer insertions” also affect other oncogenes such as *MYC*, *BCL2*, or *CCND1* and functionally confirm the effect of these insertions on gene overexpression in B-cell lymphomas with high mRNA or protein expression but not carrying the canonical translocations.

In the present study we demonstrated that 93% of cyclin D1⁺ MCL have *CCND2* or *CCND3* rearrangements. However, a small number of cases (n=4), representing 7% of cyclin D1⁺ MCL, lacked a genetic alteration and overexpression of these cyclins, despite having the morphology and phenotype of MCL. In this minority of cases we observed overexpression of *CCNE1* and *CCNE2* but without a primary structural rearrangement. The expression levels of these cyclins, although significantly higher than in other MCL and controls, were relatively moderate, not suggestive of being triggered by a translocation. In addition, all 4 cases showed concomitantly similar levels of both *CCNE1* and *CCNE2* genes, located in different chromosomes. The mechanism/s leading to their concomitant upregulation in these cases are unclear. Only one of the cases had a high-copy gain of *CCNE2* gene (at 8q22.1) but no concomitant gain of *CCNE1* (at 19q12), and these 2 genomic regions were not gained/amplified in the remaining 3 cases. A potential explanation could be that these cases

may have an upstream common dysregulation mechanism. In contrast to cyclin D genes, the rearrangement of *CCNE1* in B-cell neoplasms is exceptionally rare with only a single reported case of DLBCL with IGH/*CCNE1* rearrangement and cyclin E1 protein overexpression.⁴³ Another feature of the 4 cyclin E⁺ MCL was a high genomic complexity, which is in line with previously reported *CCNE1* dysregulation (by locus amplification and/or overexpression) in solid tumors, associated with chromosome instability and aggressive behavior,⁴⁴⁻⁴⁷ and worse prognosis in DLBCL.⁴⁸ The lack of overexpression of classic cyclin Ds in these 4 cases may make their classification as MCL debatable. The main differential diagnosis may be DLBCL with *CCNE* overexpression.⁴⁸ However, SOX11-expression has been detected only in 1 out of 339 DLBCL investigated in 5 previous studies.⁴⁹⁻⁵³ Therefore, the very rare expression of SOX11 in DLBCL and the common expression of SOX11 in MCL together with the classic or blastoid MCL morphology, CD5 and SOX11 expression, and the aggressive clinical course in our cases favor the closer relationship of these *CCNE*-positive cases with MCL rather than DLBCL. Further studies are needed to confirm the most appropriate taxonomy of these uncommon cases.

Overall, we show that cyclin D1⁻ and cyclin D1⁺ MCL share a common expression and genomic profile as well as clinical outcome.^{26,54} Our results highlight that *CCND2*, *CCND3*, and possibly also *CCNE1/E2*, may be *bona fide* alternative alterations to *CCND1* in MCL pathogenesis, that, together with SOX11 overexpression, may represent the main initial hits in MCL.⁵⁵ These findings may also have diagnostic implications. The identification of *CCND2/D3* translocations with IG genes in virtually all cyclin D1-negative MCL confirms that the morphology and phenotype combined with SOX11-positivity are appropriate to recognize these tumors. The study of *CCND2/D3* translocations described here may be useful in the differential diagnosis of tumors with blastoid or pleomorphic morphology, since lymphoblastic lymphomas may express SOX11.^{11,49} The finding of these translocations or very high *CCND2/D3/E1/E2* mRNA levels would favor the diagnosis of MCL. *CCNE1/E2* overexpression was associated with blastoid morphology, high genomic complexity, high proliferation, and short survival, consistent with the role of these cyclins as potent oncogenes.⁴⁴

In conclusion, using an integrative molecular and genetic analysis we have identified IG light chain enhancer hijacking next to *CCND2* or *CCND3* genes in 23% of cyclin D1⁻ MCL. We also recognized a small subset of aggressive cyclin D1⁺ MCL carrying cyclin E dysregulation. In addition to the pathogenic significance of these findings, the approach used here may be useful for the diagnosis of these tumors.

Acknowledgement: This work was supported by research funding from Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III PI14/00571 and PI17/01061 (SB), Fundació La Marató de TV3-Càncer/2013410 (SB), Fundació Crèdit Andorrà, Ministerio de Economía y Competitividad, SAF2015-64885-R (EC), SAF2017-87811-R (XSP) from Plan Nacional de I+D+I, Generalitat de Catalunya Suport Grups de Recerca 2017-SGR-709 (SB), 2017-SGR-1142 (EC), and the European Regional Development Fund "Una manera de fer Europa", CERCA Programme/Generalitat de Catalunya. EC is an Academia Researcher of the "Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats" of the Generalitat de Catalunya. Personal staff (Miriam Prieto and Noelia García) are supported by "Acció instrumental d'incorporació de científics i tecnòlegs PERIS 2016" (SLT002/16/00347 and SLT002/16/00336 from Generalitat de Catalunya). Thanks to: the Hematopathology Collection for sample procurement; Silvia Martín, Noelia García, Candida Gómez, Cristina Capdevila, and María Rodríguez-Rivera for excellent technical assistance; the Molecular Cytogenetic Platform of IMIM, Hospital del Mar (Barcelona) for providing BAC clones, the support of the technical staff of the molecular cytogenetic laboratories of the Institutes of Human Genetics in Kiel and Ulm, and Montserrat Puiggros from the Barcelona Supercomputing Center for support in WGS analysis. Thanks to contributors of individual cases: Iwona Włodarska (Leuven, Belgium), Philippe Gaulard (Creteil, France), Wendy Erber (Crawley, Australia), Pilar Forcada (Terrassa, Spain), Grevelyn Sosa Rotundo (Madrid, Spain), Alejandra Carvajal (San Jose, Costa Rica), Camille Gonzalez (New York, US), Nhora Silva Perez (Cali, Colombia); Lluís Rodríguez (Vic, Spain). The arrays were performed at qGenomics (www.qgenomics.com), CeGen (PTI3/0001, ISCIII-SGEFI/FEDER), and IDIBAPS Genomics core facility. This work was developed at the Centro Esther Koplowitz (CEK), Barcelona, Spain.

Author Contributions: E.C., S.Bea designed the study; D.M-G., R.V-M., J.G-A., D.T., S.Bel., C.L-O., X-S.P., S.Bea analyzed and interpreted NGS data; A.N., M.P., R.W., G.R., S.Ben., B.E., D.C., R.S., S.Bea performed and interpreted cytogenetic analysis; D.M-G., A.N., M.P., I.S., S.Bea performed and interpreted molecular studies; G.C. performed statistical analyses; I.R-C., G.R., L.dL., A.R., J-A.F., E-D.-H., K.F., J.D., D.W., D.dJ., F.C., S.O'C., S-H.S., B-G.F., L.V., E.M., G.O., L.Q-M., E-S.J. and E.C. reviewed and collected IHC and pathological data; D.M-G., A.N., E.C., and SBea wrote the manuscript; S.B. directed and supervised the research. All authors approved the final manuscript.

Other Information: Sequencing, expression, and copy number array data have been deposited at the European Genome-Phenome Archive (EGA, <http://www.ebi.ac.uk/ega/>), which is hosted at the European Bioinformatics Institute (EBI), under accession number EGAS00001003060. Copy number arrays of the cases included in Salaverria *et al* Blood

2013 had been previously deposited in Gene Expression Omnibus (GEO) under accession number GSE42854.

Conflict-of-interest disclosure: EC has received research funding from Gilead Sciences, and has been consultant for Takeda, Celgene and Gilead, and is author in a Lymphoma and Leukemia Molecular Profiling Project (LLMPP) patent "Method for selecting and treating lymphoma types" PCT/US14/64161.

REFERENCES

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris N et al. (Eds.): WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC: Lyon 2017.
2. Jares P, Colomer D, Campo E. Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma. *J.Clin.Invest* 2012;122:3416-3423.
3. Royo C, Salaverria I, Hartmann EM et al. The complex landscape of genetic alterations in mantle cell lymphoma. *Semin.Cancer Biol.* 2011;21:322-334.
4. Fu K, Weisenburger DD, Greiner TC et al. Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study based on gene expression profiling. *Blood* 2005;106:4315-4321.
5. Salaverria I, Royo C, Carvajal-Cuenca A et al. CCND2 rearrangements are the most frequent genetic events in cyclin D1(-) mantle cell lymphoma. *Blood* 2013;121:1394-1402.
6. Gesk S, Klapper W, Martin-Subero JI et al. A chromosomal translocation in cyclin D1-negative/cyclin D2-positive mantle cell lymphoma fuses the CCND2 gene to the IGK locus. *Blood* 2006;108:1109-1110.
7. 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;204:162-164.
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;111:5683-5690.
9. 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;111:1745-1746.
10. Quintanilla-Martinez L, Slotta-Huspenina J, Koch I et al. Differential diagnosis of cyclin D2+ mantle cell lymphoma based on fluorescence in situ hybridization and quantitative real-time-PCR. *Haematologica* 2009;94:1595-1598.
11. Mozos A, Royo C, Hartmann E et al. SOX11 expression is highly specific for mantle cell lymphoma and identifies the cyclin D1-negative subtype. *Haematologica* 2009;94:1555-1562.
12. Hartmann EM, Campo E, Wright G et al. Pathway discovery in mantle cell lymphoma by integrated analysis of high-resolution gene expression and copy number profiling. *Blood* 2010;116:953-961.
13. Ventura RA, Martin-Subero JI, Jones M et al. FISH analysis for the detection of lymphoma-associated chromosomal abnormalities in routine paraffin-embedded tissue. *J.Mol.Diagn.* 2006;8:141-151.
14. ISCN 2016: McGowan-Jordan, J., Simons A., Schmid, M. ISCN: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2016). S. Karger, Basel.

15. Puente XS, Bea S, Valdes-Mas R et al. Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 2015;526:519-524.
16. Bea S, Valdes-Mas R, Navarro A et al. Landscape of somatic mutations and clonal evolution in mantle cell lymphoma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2013;110:18250-18255.
17. Moncunill V, Gonzalez S, Bea S et al. Comprehensive characterization of complex structural variations in cancer by directly comparing genome sequence reads. *Nat.Biotechnol.* 2014;32:1106-1112.
18. Layer RM, Chiang C, Quinlan AR, Hall IM. LUMPY: a probabilistic framework for structural variant discovery. *Genome Biol.* 2014;15:R84.
19. Boeva V, Zinovyev A, Bleakley K et al. Control-free calling of copy number alterations in deep-sequencing data using GC-content normalization. *Bioinformatics*. 2011;27:268-269.
20. Puente XS, Pinyol M, Quesada V et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 2011;475:101-105.
21. Cibulskis K, Lawrence MS, Carter SL et al. Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples. *Nat.Biotechnol.* 2013;31:213-219.
22. Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat.Appl.Genet.Mol.Biol.* 2004;3:Article3.
23. Beekman R, Chapaprieta V, Russinol N et al. The reference epigenome and regulatory chromatin landscape of chronic lymphocytic leukemia. *Nat.Med.* 2018;24:868-880.
24. Zhang J, Jima D, Moffitt AB et al. The genomic landscape of mantle cell lymphoma is related to the epigenetically determined chromatin state of normal B cells. *Blood* 2014;123:2988-2996.
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;26:1895-1898.
26. Clot G, Jares P, Gine E et al. A new molecular assay and genomic complexity predict outcome in conventional and leukemic non-nodal mantle cell lymphoma. *Blood* 2018
27. 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;98:2837-2844.
28. Watanuki J, Hatakeyama K, Sonoki T et al. Bone marrow large B cell lymphoma bearing cyclin D3 expression: clinical, morphologic, immunophenotypic, and genotypic analyses of seven patients. *Int.J.Hematol.* 2009;90:217-225.
29. Wren D, Walker BA, Bruggemann M et al. Comprehensive translocation and clonality detection in lymphoproliferative disorders by next-generation sequencing. *Haematologica* 2017;102:e57-e60.
30. Sole F, Espinet B, Salido M et al. Translocation t(6;14)(p12;q32): a novel cytogenetic abnormality in splenic lymphoma with villous lymphocytes. *Br.J.Haematol.* 2000;110:241-243.
31. Tian E, Sawyer JR, Heuck CJ et al. In multiple myeloma, 14q32 translocations are

- nonrandom chromosomal fusions driving high expression levels of the respective partner genes. *Genes Chromosomes.Cancer* 2014;53:549-557.
32. Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J et al. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia* 2009;23:2210-2221.
 33. Ulve R, Rault M, Bahin M et al. Discovery of human-similar gene fusions in canine cancers. *Cancer Res.* 2017;77:5721-5727.
 34. Zimmerman MW, Liu Y, He S et al. MYC Drives a Subset of High-Risk Pediatric Neuroblastomas and Is Activated through Mechanisms Including Enhancer Hijacking and Focal Enhancer Amplification. *Cancer Discov.* 2018;8:320-335.
 35. Valentijn LJ, Koster J, Zwijnenburg DA et al. TERT rearrangements are frequent in neuroblastoma and identify aggressive tumors. *Nat.Genet.* 2015;47:1411-1414.
 36. Northcott PA, Buchhalter I, Morrissey AS et al. The whole-genome landscape of medulloblastoma subtypes. *Nature* 2017;547:311-317.
 37. Northcott PA, Lee C, Zichner T et al. Enhancer hijacking activates GFI1 family oncogenes in medulloblastoma. *Nature* 2014;511:428-434.
 38. Grobner SN, Worst BC, Weischenfeldt J et al. The landscape of genomic alterations across childhood cancers. *Nature* 2018;555:321-327.
 39. Weischenfeldt J, Dubash T, Drainas AP et al. Pan-cancer analysis of somatic copy-number alterations implicates IRS4 and IGF2 in enhancer hijacking. *Nat.Genet.* 2017;49:65-74.
 40. Affer M, Chesi M, Chen WG et al. Promiscuous MYC locus rearrangements hijack enhancers but mostly super-enhancers to dysregulate MYC expression in multiple myeloma. *Leukemia* 2014;28:1725-1735.
 41. Chapuy B, Stewart C, Dunford AJ et al. Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanisms and outcomes. *Nat.Med.* 2018;24:679-690.
 42. Ryan RJ, Drier Y, Whitton H et al. Detection of Enhancer-Associated Rearrangements Reveals Mechanisms of Oncogene Dysregulation in B-cell Lymphoma. *Cancer Discov.* 2015;5:1058-1071.
 43. Nagel I, Akasaka T, Klapper W et al. Identification of the gene encoding cyclin E1 (CCNE1) as a novel IGH translocation partner in t(14;19)(q32;q12) in diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica* 2009;94:1020-1023.
 44. Spruck CH, Won KA, Reed SI. Deregulated cyclin E induces chromosome instability. *Nature* 1999;401:297-300.
 45. Hubalek MM, Widschwendter A, Erdel M et al. Cyclin E dysregulation and chromosomal instability in endometrial cancer. *Oncogene* 2004;23:4187-4192.
 46. Alsina M, Landolfi S, Aura C et al. Cyclin E amplification/overexpression is associated with poor prognosis in gastric cancer. *Ann.Oncol.* 2015;26:438-439.
 47. Scaltriti M, Eichhorn PJ, Cortes J et al. Cyclin E amplification/overexpression is a

- mechanism of trastuzumab resistance in HER2+ breast cancer patients. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 2011;108:3761-3766.
48. Frei E, Visco C, Xu-Monette ZY et al. Addition of rituximab to chemotherapy overcomes the negative prognostic impact of cyclin E expression in diffuse large B-cell lymphoma. J.Clin.Pathol. 2013;66:956-961.
 49. Dector M, Ek S, Sundberg M et al. Strong lymphoid nuclear expression of SOX11 transcription factor defines lymphoblastic neoplasms, mantle cell lymphoma and Burkitt's lymphoma. Haematologica 2009;94:1563-1568.
 50. Chen YH, Gao J, Fan G, Peterson LC. Nuclear expression of sox11 is highly associated with mantle cell lymphoma but is independent of t(11;14)(q13;q32) in non-mantle cell B-cell neoplasms. Mod.Pathol. 2010;23:105-112.
 51. 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;61:685-693.
 52. Soldini D, Valera A, Sole C et al. Assessment of SOX11 expression in routine lymphoma tissue sections: characterization of new monoclonal antibodies for diagnosis of mantle cell lymphoma. Am.J.Surg.Pathol. 2014;38:86-93.
 53. Xu S, Dong Y, Huo Z et al. SOX11: A Potentially Useful Marker in Surgical Pathology A Systematic Analysis of SOX11 Expression in Epithelial and Nonepithelial Tumors. Histopathology 2018
 54. Rosenquist R, Bea S, Du MQ, Nadel B, Pan-Hammarstrom Q. Genetic landscape and deregulated pathways in B-cell lymphoid malignancies. J.Intern.Med. 2017;282:371-394.
 55. Bea S, Amador V. Role of SOX11 and Genetic Events Cooperating with Cyclin D1 in Mantle Cell Lymphoma. Curr.Oncol.Rep. 2017;19:43.

Supplemental material

CCND2 and CCND3 hijack immunoglobulin light chain enhancers in cyclin D1-negative mantle cell lymphoma

David Martín-García, Alba Navarro *et al.*

SUPPLEMENTAL TABLES

Supplemental Table S1. Commercial and bacterial artificial chromosomes (BAC)-labeled probes used for FISH analyses.

BAC/Probe	Region	Chrom. location (hg19)	Reference	Fluorescent dye
CCND2 BAP-1*				
RP11-578L13	5'	chr12:4002511-4203622	^{1,2}	Spectrum Orange
RP11-388F6	3'	chr12:4443393-4613592	^{1,2}	Spectrum Green
CCND2 BAP-2*				
RP11-358F19	5'	chr12:3991712-4180381	Unpublished	Spectrum Red
RP11-8E02	3'	chr12:4434027-4604218	Unpublished	Spectrum Green
CCND3 BAP				
RP1-321B9	5'	chr6:42159875-42243431	³	Spectrum Orange
RP1-139D8	5'	chr6:41992892-42159974	³	Spectrum Orange
RP5-973N23	3'	chr6:41694188-41810693	³	Spectrum Green
RP11-298J23	3'	chr6:41564073-41743535	³	Spectrum Green
CCNE1 BAP				
RP11-17N20	3'	chr19:30370277-30526346	Unpublished	Spectrum Red
CTD-2063E21	5'	chr19:30097638-30224016	-	Spectrum Green
LSI IGH BAP		14q32.3	Abbott Molecular	Spectrum Green/Orange
XL IGL BAP		22q11.22	Metasystems	Spectrum Green/Orange
XL IGK BAP		2p11.2	Metasystems	Spectrum Green/Orange
Locus specific				
RP11-928N17	CCND2	chr12:4274557-4482113	-	Spectrum Red
CTD-3053I1	CCND3	chr6:41751478-41951375	-	Spectrum Red
RP11-104J24	CCNE1	chr19:30250326-30400791	-	Spectrum Red
RP11-272K10	CCNE2	chr8:95874697-96025074	-	Spectrum Red
RP11-1134E24	IGK-enh [#]	chr2:89135166-89284041	-	Spectrum Green
RP11-15J7	IGK-enh [#]	chr2:89140332-89302455	-	Spectrum Green
XCE 8	cen	Centromere chr8	Metasystems	Spectrum Orange

BAP: break-apart probe, cen: centromere, enh: enhancer.

*The design of both CCND2 BAP probes was virtually the same, only the BACs selected were different.

[#]The BACs used do not cover exclusively the enhancer region of IGK.

Supplemental Table S2. Next-generation sequencing and molecular techniques applied to each sample.

Case	DNA origin	MP-WGS	WGS	WES	Sanger	FISH	CN array	GEP	qPCR	IGHV identity/V-gene
ID3_1	FT	X		X	X	X	SNP-500K	X		95.85% IGHV3-48
ID3_2	FFPE					X	OncoScan			
ID5	FT			X	X	X	SNP-500K	X		97.11% IGHV4-39
ID6	FT	X		X	X	X	SNP-500K	X		
ID7	FFPE					X				
ID9	FFPE					X	Agilent 1M	X	X	
ID10	FFPE					X			X	
ID12_1	FFPE					X	Agilent 1M		X	100% IGHV3-21
ID12_2	FFPE					X	Agilent 1M	X	X	
ID13	FFPE					X	Agilent 1M			
ID14	FFPE					X	Agilent 1M	X	X	
ID15	FFPE					X	Agilent 1M			
ID16	FFPE					X	Agilent 1M			
ID17	FFPE					X	Agilent 1M		X	
ID18	FFPE					X	Agilent 1M			97.21% IGHV4-34
ID24	FFPE					X			X	99.59% IGHV1-3
ID26	FFPE					X	Agilent 1M	X	X	99.15% IGHV3-74
ID28	FFPE					X	Agilent 1M	X	X	100% IGHV1-8
ID29	FFPE					X	Agilent 1M		X	
ID31	FFPE					X	Agilent 1M		X	
ID32	FFPE					X	Agilent 1M			
ID34	FFPE					X	Agilent 1M	X	X	
ID35	FFPE					X	Agilent 1M		X	
ID36	FFPE					X	Agilent 1M			
ID37	FFPE					X	Agilent 1M			97.17% IGHV4-39
ID39	FFPE					X	Agilent 1M	X	X	97.44% IGHV3-48
ID40	FFPE					X	Agilent 1M	X	X	98.74% IGHV3-9
ID42	FFPE					X	Agilent 1M			
ID43	FFPE					X			X	
ID44	FFPE					X	OncoScan		X	
ID55	FFPE					X	Agilent 1M	X	X	
ID56	FFPE					X	Agilent 1M	X	X	
ID59	FFPE					X	Agilent 1M	X	X	95.07% IGHV4-69
ID60	FFPE					X	Agilent 1M	X	X	95.93% IGHV4-34
ID61	FFPE					X	Agilent 1M	X	X	
ID62	FFPE					X				

Case	DNA origin	MP-WGS	WGS	WES	Sanger	FISH	CN array	GEP	qPCR	IGHV identity/V-gene
ID64	FFPE					X				
ID65_1	FFPE					X	Agilent 1M	X	X	99.60% IGHV3-21
ID65_2	FFPE					X	Agilent 1M			
ID66_1	FFPE					X	Agilent 1M			
ID66_2	FT					X	SNP- 6.0			
ID67	FFPE					X	Agilent 1M	X		96.39% IGHV3-23
ID68	FFPE					X		X		99.19% IGHV3-30
ID70	FFPE					X	Agilent 1M	X		
ID73_1	FT					X	SNP- 6.0			97.58% IGHV3-21
ID73_2	FT	X	X			X	SNP- 6.0	X		
ID75	FFPE					X	OncoScan			
ID76	FT	X				X	SNP- 6.0	X		
ID77	FFPE					X	OncoScan	X		
ID79	FFPE					X				
ID80	FFPE					X				
ID83	FFPE					X	OncoScan	X		
ID84	FFPE					X		X		99.60% IGHV3-21
ID85	FFPE					X		X		100% IGHV4-34
ID86	FFPE					X	OncoScan	X		
ID87	FFPE					X	OncoScan	X		
ID88	FFPE					X		X		
ID90	FFPE					X	OncoScan	X		100% IGHV3-21
ID91	FFPE					X		X		99.20% IGHV3-21
ID92	FFPE					X	OncoScan	X		100% IGHV4-59
ID93	FFPE					X		X		95.65% IGHV1-3

CN: copy number, FT: frozen tissue, FFPE: formalin-fixed paraffin embedded tissue, GEP: gene expression profile, IGHV: immunoMP-WGS: mate-pair whole-genome sequencing, WES: whole-exome sequencing, WGS: whole genome sequencing, qPCR: quantitative PCR.

Supplemental Table S3. Primers used for verification of IG and CCND3 breakpoints by Sanger sequencing.

Primer name	Data	Sequence (5'- 3')
ID3v2_tel_F	MP-WGS	AATTGCATTGGCTCATTCT
ID3v2_tel_R	MP-WGS	CCTCCCTTGAATTGTCCAATAA
ID3_cen_F	MP-WGS	AGATCAGCTGGGTAAACGA
ID3_cen_R	MP-WGS	AATTCCAGCCTCCCTTCATT
ID6-F	WES	TACTGGCCATCAGACCCAAA
ID6-R	WES	CCAAGAACCGAAGACAGCTC
ID5-left*	WES	CGGTCTTGGGACATTCAAGAAA
ID5-right	WES	GGAGGCGTCAAGATCCACTA

cen: centromeric break, F: forward, MP-WGS: mate-pair whole-genome sequencing, R: reverse, tel: telomeric break, WES: whole-exome sequencing.

*This primer includes the breakpoint.

Supplemental Table S4. TaqMan assays (Thermo Fisher Scientific Inc.) used for quantitative PCR analyses.

Gene Symbol	Assay ID	Amplicon size (base pairs)	Reference sequence
CCND2	Hs_00153380_m1	69	MN_001759.3
CCND3	Hs_00236949_m1	67	MN_01136017.3
CCNE1	Hs_01026536_m1	64	MN_001322262.1
CCNE2	Hs_00180319_m1	92	MN_057749.2
GUSB	Hs_00939627_m1	96	MN_001293104.1

Supplemental Table S5. Complete FISH and gene expression results of *CCND2/D3*, *CCNE1/E2*, and IG genes of the 56 cyclin D1⁺ MCL.

ID	Group	Transl. Status	<i>CCND2</i> BAP	<i>CCND3</i> BAP	#	<i>CCNE1</i> #	<i>CCNE2</i> #	IGH BAP	IGK BAP	IGL BAP	IGK- <i>CCND2</i> cryptic ins.	IGK- <i>CCND3</i> cryptic ins.	NGS/ Sanger
ID3	D3	D3-K	neg	neg				neg	neg	neg		pos	MP- WGS/ Sanger
ID5	D3	D3-L	neg	neg				neg	neg	neg			WES/ Sanger
ID6	D3	D3-K	neg	neg				neg	neg	neg		pos	MP- WGS/ WES/ Sanger
ID7	D2	D2-K	pos					neg	pos	neg			
ID9	D3	D3-K	neg	neg				neg	neg	neg		pos	
ID10	D2	D2-K	pos	neg				neg	pos	neg			
ID12	D2	D2-K	neg	neg					neg	neg	pos		
ID13	D2	D2-K	pos	neg				neg	pos				
ID14	D2	D2-H	pos					pos					
ID15	D2	D2-K	pos						pos				
ID16	D2	D2-break	pos					neg	neg	n.e.			
ID17	D2	D2-K	pos					neg	pos				
ID18	D2	D2-K	pos	neg				neg	pos	neg			
ID24	D2	D2-H	pos	neg				pos	neg	neg			
ID26	E1/ E2	neg	neg	neg	BAP neg IGKe neg		IGKe neg		neg	neg	neg		
ID28	D2	D2-K	pos					neg	pos	neg			
ID29	D2	D2-break	pos					neg	neg	neg			
ID31	D2	D2-break	pos	neg				neg	neg	neg			
ID32	D2	D2-K	pos						pos				
ID34	D2	D2-break	pos	neg									
ID35	D2	D2-L	pos					neg	neg	pos			
ID36	D2	D2-L	pos					neg	neg	pos			
ID37	D2	D2-L	pos					neg	neg	pos			
ID39	D2	D2-L	pos					neg	neg	pos			
ID40	D2	D2-K	pos					neg	pos	neg			
ID42	D2	D2-L	pos							pos			
ID43	D2	D2-H	pos					pos	neg				
ID44	D2	D2-K	post†						pos				
ID55	D2	D2-break	post†					n.e.	neg	neg			
ID56	D2	D2-K	neg	n.e.				neg	neg		pos		
ID59	D2	D2-break	pos					neg	neg				
ID60	E1/ E2	neg	neg	n.e.	BAP neg IGKe neg		IGKe n.e.		neg	neg	neg		
ID61	D2	D2-K	pos					neg	pos	neg			
ID62	D2	D2-H*	pos										
ID64	D2	D2-break	pos					neg					
ID65	D2	D2-K	neg†	neg				neg	neg	neg	pos		
ID66	D2	D2-K	pos						pos				
ID67	D2	D2-K	pos						pos				

ID	Group	Transl. Status	CCND2 BAP	CCND3 BAP	#	CCNE1 #	CCNE2 #	IGH BAP	IGK BAP	IGL BAP	IGK- CCND2 cryptic ins.	IGK CCND3 cryptic ins.
ID68	D2	D2-K	neg	n.e.							pos	
ID70	D3	D3-K	neg†	neg				neg	neg	neg		pos
ID73	E1/ E2	neg	neg	neg	BAP	n.e.	neg†			n.e.		
ID75	D2	D2-K	pos						pos			
ID76	D2	D2-K*	pos									
ID77	E1/ E2	neg	neg	n.e.	BAP	neg	IGKe	n.e.				
ID79	D2	D2-K	pos					neg	pos	neg		
ID80	D2	D2-K	pos						pos			
ID83	D2	D2- break	pos					neg		n.e.		
ID84	D2	D2-K	pos					pos		neg		
ID85	D2	D2-K	pos					neg	pos			
ID86	D3	D3-K	neg	neg				neg			pos	
ID87	D3	D3-K	neg	neg†				neg			pos†	
ID88	D2	D2-K	pos						pos			
ID90	D3	D3-K	neg	neg							pos	
ID91	D2	D2- break	pos					neg		n.e.		
ID92	D3	D3-K	neg	neg							pos	
ID93	D2	D2-K	pos					pos				

Amp: amplification, BAP: break-apart probe, D2: MCL with *CCND2* rearrangement and overexpression, D3: MCL with *CCND3* rearrangement and overexpression, D2-break: *CCND2* break with unknown partner, E1/E2: MCL with *CCNE1* and *CCNE2* concomitant overexpression, GEP: gene expression profiling, IGKe: IGK enhancer, ins: insertion, neg: negative, n.e.: non-evaluable, pos: positive, transl: translocation.

*Positive for *CCND2*/IGH or IGK/*CCND2* by FISH with locus specific probes and/or by karyotype.

#The different hybridizations performed with *CCNE1* or *CCNE2* probes are detailed for the 4 cases, including FISH with *CCNE2* break and FISH using the combination of IGK-enhancer (IGKe) with *CCNE1* or *CCNE2*.

†Gain of the locus detected by FISH.

Supplemental Table S6. Interchromosomal structural variants detected by mate-pair WGS analysis in 3 cyclin D1⁻ MCL cases (hg19).

Case	Chr1	Position 1	Position 1b	Chr 2	Position 2	Position 2b	CNA 1	CNA 2	Primary SV
ID3	2	89130000	89140000	6	41960000	41970000			IGK/CCND3
ID3	3	154520000	154540000	6	107500000	107540000	Yes	Yes	
ID3	6	114510000	114520000	9	3700000	3710000	Yes	Yes	
ID3	6	124310000	124320000	9	112440000	112450000	Yes	Yes	
ID6	1	33510000	33520000	7	24450000	24460000			
ID6	1	160860000	160870000	4	112598000	112600000			
ID6	2	89150000	89160000	6	41920000	41930000			IGK/CCND3
ID6	5	43080000	43090000	7	80530000	80540000			
ID6	6	7310000	7320000	13	51620000	51640000			
ID6	6	51840000	51850000	10	92244400	92253000			
ID76	1	106680000	106690000	13	91408684	91418684			
ID76	1	106670000	106680000	13	91414411	91424411			
ID76	2	89150000	89160000	12	4342915	4352915			IGK/CCND2
ID76	2	89180000	89190000	12	4333595	4343595			IGK/CCND2
ID76	2	29980000	29990000	10	48415075	48425075			
ID76	3	123930000	123940000	13	92051732	92061732	Yes	Yes	
ID76	3	124220000	124230000	13	91192485	91202485			
ID76	3	124200000	124210000	13	91300059	91310059			
ID76	3	133550000	133560000	13	58884223	58894223		Yes	
ID76	3	124320000	124330000	13	91258208	91268208			
ID76	3	124520000	124530000	13	80886856	80896856	Yes	Yes	
ID76	5	430000	440000	11	63714793	63724793			
ID76	5	420000	430000	11	63717789	63727789			
ID76	9	105810000	105820000	15	100910062	10092006	Yes	Yes	
					2				
ID76	10	48410000	48420000	2	29983938	29993938			
ID76	11	63720000	63730000	5	424856	434856			
ID76	13	80890000	80900000	3	124525613	12453561	Yes	Yes	
					3				
ID76	13	90870000	90880000	3	124620979	12463097	Yes	Yes	
					9				
ID76	13	91260000	91270000	3	124318783	12432878			
					3				
ID76	13	91300000	91310000	3	124197467	12420746			
					7				
ID76	13	58880000	58890000	3	133549364	13355936	Yes		
					4				
ID76	13	91200000	91210000	3	124218054	12422805			
					4				
ID76	15	100910000	100920000	9	105806865	10581686	Yes	Yes	
					5				

Chr 1, Chr 2: the 2 chromosomes involved in the rearrangement, CNA 1, CNA 2: copy number alterations present in the breakpoint 1 and 2, respectively, Pos 1, Pos 1b: interval of the breakpoint in the first (Chr 1), Pos 2, Pos 2b: interval of the breakpoint in the second chromosome involved in the structural variant (Chr 2).

Supplemental Table S7. Structural variants detected by WGS (mate-pair and paired-end) in the cyclin D1⁺ and cyclin D2⁺ MCL case ID73 (hg19).

Chr 1	Position 1	Chr 2	Position 2	Library	Algorithm*	Type	CNA 1	CNA 2	Affected genes
chr2	32605430	chr2	32460793	PE	S	Intra			BIRC6- NLRC4
chr2	78796419	chr2	78799187	PE	S	Intra			
chr2	85242613	chr12	32610437	PE	S	Inter			KCMF1-FGD4
chr2	85242658	chr9	123193506	PE-MP	S-H	Inter			KCMF1-CDK5RAP2
chr2	111623747	chr16	89636965	PE-MP	L-H	Inter			ACOXL-
chr2	111875807	chr2	112004073	PE	S	Intra			-MIR4435-1HG
chr2	111920331	chr16	89637012	PE-MP	S-L-H	Inter			BCL2L11-
chr2		chr2	231315686	PE	L	Intra			SP100
chr3	22471929	chr6	145300900	PE	S-L	Inter	Yes	Yes	
chr3	24278915	chr6	157176493	PE	S-L	Inter	Yes	Yes	THRHB-ARID1B
chr3	29890000	chr6	114870066	MP	H	Inter		Yes	RBMS3-
chr3	29900000	chr6	114880066						
chr3	49260945	chr3	50655165	PE	L	Intra	Yes	Yes	CCDC36- MAPKAPK3
chr3	105443572	chr6	132820773	PE	S	Inter	Yes	Yes	CBLB-STX7
chr3	105507564	chr6	125420725	PE-MP	S-L-H	Inter	Yes		CBLB-
chr3	106852345	chr3	106924776	PE	S	Intra			LINC00882
chr3	106924705	chr3	106852236	PE	S	Intra			LINC00882
chr3	122462393	chr6	156403077	PE-MP	S-L-H	Inter		Yes	HSPBAP1-
chr3	122460000	chr6	135536311	MP	H	Inter			HSPBAP1-
chr3	122470000	chr6	135546311						
chr3	132104159	chr3	115338256	PE	S	Intra			
chr3	187489719	chr6	104184816	PE-MP	L-H	Inter		Yes	
chr4	91150655	chr4	91749027	PE	S-L	Intra	Yes	Yes	CCSER1
chr5	25797188	chr5	25752663	PE	S	Intra			
chr6	127507698	chr18	78014475	PE	L	Inter		Yes	RSPO3
chr6	130869466	chr6	157310615	PE	S-L	Intra		Yes	-ARID1B
chr6	134910000	chr3	29890453	MP	H	Inter			-RBMS3
chr6	134920000	chr3	29900453						
chr6	135530000	chr3	122460197	MP	H	Inter			MYB-HSPBAP1
chr6	135540000	chr3	122470197						
chr6	136891590	chr3	132104583	PE-MP	S-H	Inter			MAP3K5-
chr6	136960484	chr18	77205507	PE-MP	S-L-H	Inter		Yes	MAP3K5-NFATC1
chr6	141883015	chr3	115335294	PE	S	Inter			
chr6	142796723	chr3	105507547	PE	S-L	Inter	Yes	Yes	-CBLB
chr6	145332773	chr6	145332871	PE	S	Intra	Yes	Yes	
chr6	147753309	chr6	127509761	PE	S	Intra			-RSPO3
chr8	89690000	chr18	48581050	MP	H	Inter	Yes	Yes	-SMAD4
chr8	89700000	chr18	48591050						
chr8	90875850	chr8	91735970	PE	S	Intra	Yes		-TMEM64
chr8	90898425	chr18	44102601	PE	S	Inter	Yes		-LOXHD1
chr8	90920000	chr18	44095027	MP	H	Inter	Yes		OSGIN2-LOXHD1
chr8	90930000	chr18	44105027						
chr8	90930000	chr18	44092192	MP	H	Inter	Yes		OSGIN2-LOXHD1
chr8	90940000	chr18	44102192						
chr8	90969950	chr8	91032543	PE	S-L	Intra	Yes	Yes	NBN-DECR1
chr8	91593682	chr18	55055800	PE-MP	S-L-H	Inter	Yes	Yes	
chr8	91742645	chr8	91768347	PE	S-L	Intra	Yes	Yes	TMEM64
chr8	94917360	chr8	91032535	PE	S	Intra		Yes	PDP1-DECR1
chr8	95053197	chr8	89658766	PE	S	Intra	Yes	Yes	
chr9	21906122	chr9	22007374	PE	L	Intra	Yes	Yes	MTAP-CDKN2B-AS1
chr9	21906123	chr9	21998682	PE	L	Intra	Yes	Yes	MTAP-CDKN2B-AS1

Chr 1	Position 1	Chr 2	Position 2	Library	Algorithm*	Type	CNA 1	CNA 2	Affected genes
chr9	21998774	chr9	22007374	PE	L	Intra	Yes	Yes	<i>CDKN2B-AS1</i>
chr9	37810261	chr9	37810213	PE	S	Intra			<i>DCAF10</i>
chr11	61841813	chr14	81786774	PE	L	Inter			- <i>STON2</i>
chr12	32610366	chr9	25880494	PE	S	Inter			<i>FGD4-</i>
chr12	96340000	chr2	50762177	MP	H	Inter			<i>AMDHD1-NRXN1</i>
chr12	96350000		50772177						
chr13	31724986	chr11	83807112	PE-MP	S-L-H	Inter	Yes		<i>HSPH1-DLG2</i>
chr13	48724010	chr13	48896200	PE	L	Intra	Yes	Yes	- <i>RB1</i>
chr13	48920363	chr13	49689000	PE	L	Intra	Yes	Yes	<i>RB1-FNDC3A</i>
chr14	45610000	chr2	70733462	MP	H	Inter			<i>FANCM-TGFA</i>
chr14	45620000		70743462						
chr18	44090000	chr8	90924821	MP	H	Inter		Yes	<i>LOXHD1-OSGIN2</i>
chr18	44100000		90934821						
chr18	44102584	chr18	48544346	PE	S-L	Intra		Yes	<i>LOXHD1-SMAD4</i>
chr18	44141025	chr18	54708286	PE	S	Intra		Yes	<i>LOXHD1-</i>
chr18	48584623	chr8	91025448	PE-MP	S-H	Inter	Yes	Yes	<i>SMAD4-DECRI</i>
chr18	55050000	chr8	91577816	MP	H	Inter	Yes	Yes	
chr18	55060000		91587816						
chr18	77205553	chr6	134906326	PE-MP	S-H	Inter	Yes		<i>NFATC1-</i>
chr18	78014430	chr6	130899751	PE-MP	S-L-H	Inter	Yes		
chr19	1227924	chr19	1428961	PE	L	Intra			<i>STK11-DAZAP1</i>
chr19	2117444	chr19	2260245	PE	L	Intra			<i>AP3D1-JSRP1</i>
chr19	12676128	chr19	13368794	PE	L	Intra	Yes	Yes	- <i>CACNA1A</i>
chr19	18021099	chr19	19035828	PE	L	Intra	Yes	Yes	- <i>DDX49</i>
chr19	18229064	chr19	18256841	PE	S-L	Intra	Yes	Yes	<i>MAST3</i>
chr22	46580000	chr19	33277912	MP	H	Inter	Yes	Yes	<i>PPARA-TDRD12</i>
chr22	46590000		33287912						
chrX	79669626	chrX	79825980	PE	S-L	Intra			<i>FAM46D-</i>

Chr 1, Chr 2: the 2 rearranged chromosomes, CNA 1, CNA 2: copy number alteration detected in both breakpoints, Inter: interchromosomal rearrangement, Intra: intrachromosomal rearrangement, MP: mate-pair whole-genome sequencing, PE: paired-end whole-genome sequencing.

In the last column the presence of “ - ” denotes position 1 or position 2 of the affected gene.

*The abbreviations S, L indicate "Smufin and Lumpy", respectively, used for SV in the WGS analysis; whereas H indicates "in-house script" used for SV in the MP-WGS analysis.

Supplemental Table S8. Protein-coding mutations of cyclin D1⁺ and cyclin D2⁺ MCL case ID73 (hg19).

Chr	Position	Ref	Obs	Type	Gene	Codon	Protein	VAF (%)	Predict .	Sanger *
chr1	156105059	C	T	missense	LMNA	c.892C>T	p.Arg298Cys	39.4	D/D/D	
chr1	248185661	A	T	stop gained	OR2L5	c.412A>T	p.Arg138	39.5	B/./D	
chr3	73433538	G	A	missense	PDZRN3	c.2179C>T	p.Arg727Cys	41.7	D/D/D	
chr4	94377059	G	A	missense	GRID2	c.1792G>A	p.Gly598Arg	38.6	B/D/D	
chr5	133496711	T	G	missense	SKP1	c.282A>C	p.Lys94Asn	28.6	B/D/D	
chr6	44147780	A	T	missense	CAPN11	c.1520A>T	p.Glu507Val	38.1	D/D/D	
chr6	128306918	G	A	stop gained	PTPRK	c.3217C>T	p.Arg1073*	36.4	B/./D	
chr7	100085885	C	T	missense	NYAP1	c.541C>T	p.Pro181Ser	33.3	B/B/B	
chr7	122757622	G	A	missense	SLC13A1	c.1553C>T	p.Pro518Leu	28.6	D/D/D	
chr8	77618608	A	T	missense	ZFHX4	c.2285A>T	p.Lys762Ile	47.6	D/D/D	
chr8	103845398	A	G	missense	AZIN1	c.790T>C	p.Ser264Pro	16.1	D/B/D	Yes
chr8	110509210	T	A	missense	PKHD1L	c.10390T	p.Tyr3464As	17	D/D/D	Yes
chr8	110509217	A	C	missense	PKHD1L	c.10397A	p.Asn3466T	17.5	B/D/D	Yes
chr9	7174671	C	T	missense	KDM4C	c.2174C>T	p.Pro1038Le	20.0	D/D/D	
chr9	12694226	C	T	missense	TYRP1	c.230C>T	p.Pro77Leu	32.3	B/B/D	
chr10	123274833	G	A	missense	FGFR2	c.1088C>T	p.Ala363Val	40.7	B/B/D	
chr11	17627673	C	T	missense	OTOG	c.3964C>T	p.Arg1395Cy	42.4	D/D/D	
chr11	18369431	G	A	missense	GTF2H1	c.82G>A	p.Gly340Arg	25.6	B/B/D	
chr11	31327808	C	A	missense	DCDC1	c.562G>T	p.Ala188Ser	32.6	B/D/B	
chr11	70544862	C	T	missense	SHANK2	c.677G>A	p.Arg227His	25.9	D/D/D	Yes
chr12	7647946	C	A	missense	CD163	c.1151G>T	p.Gly384Val	23.5	D/D/D	Yes
chr14	23842422	C	T	missense	IL25	c.95C>T	p.Thr32Ile	30.8	D/B/B	
chr15	71188227	G	C	missense	LRRC49	c.145G>C	p.Gly49Arg	40.0	B/D/D	
chr15	75015000	T	C	missense	CYP1A1	c.439A>G	p.Ile147Val	37.5	B/B/B	
chr15	79750279	G	A	missense	KIAA102	c.1790G>A	p.Cys597Tyr	40.0	./D/D	
chr16	71683304	G	A	missense	PHLPP2	c.3461C>T	p.Pro1154Le	31.8	D/D/D	
chr17	57758724	A	T	missense	CLTC	c.3134A>T	p.Asn1045Ile	45.9	D/D/D	
chr20	30436646	G	A	missense	DUSP15	c.689C>T	p.Pro230Leu	34.4	D/D/B	Yes
chr20	60903462	C	T	missense	LAMA5	c.4487G>A	p.Gly1496As	24.0	D/D/D	
chrX	66937326	G	A	missense	AR	c.584G>A	p.Arg727His	38.2	D/D/D	
chrX	69456990	A	C	missense	AWAT1	c.352A>C	p.Thr118Pro	22.2	D/D/D	Yes

Chr: chromosome, Obs: observed, Ref: reference, SNV: single nucleotide variants, VAF: variant allele frequency. The functional predictors (Predict.) used are SIFT/Polyphen2/MutationTaster and the functional effects are categorized as D: Damaging, B: Benign, .: NA.

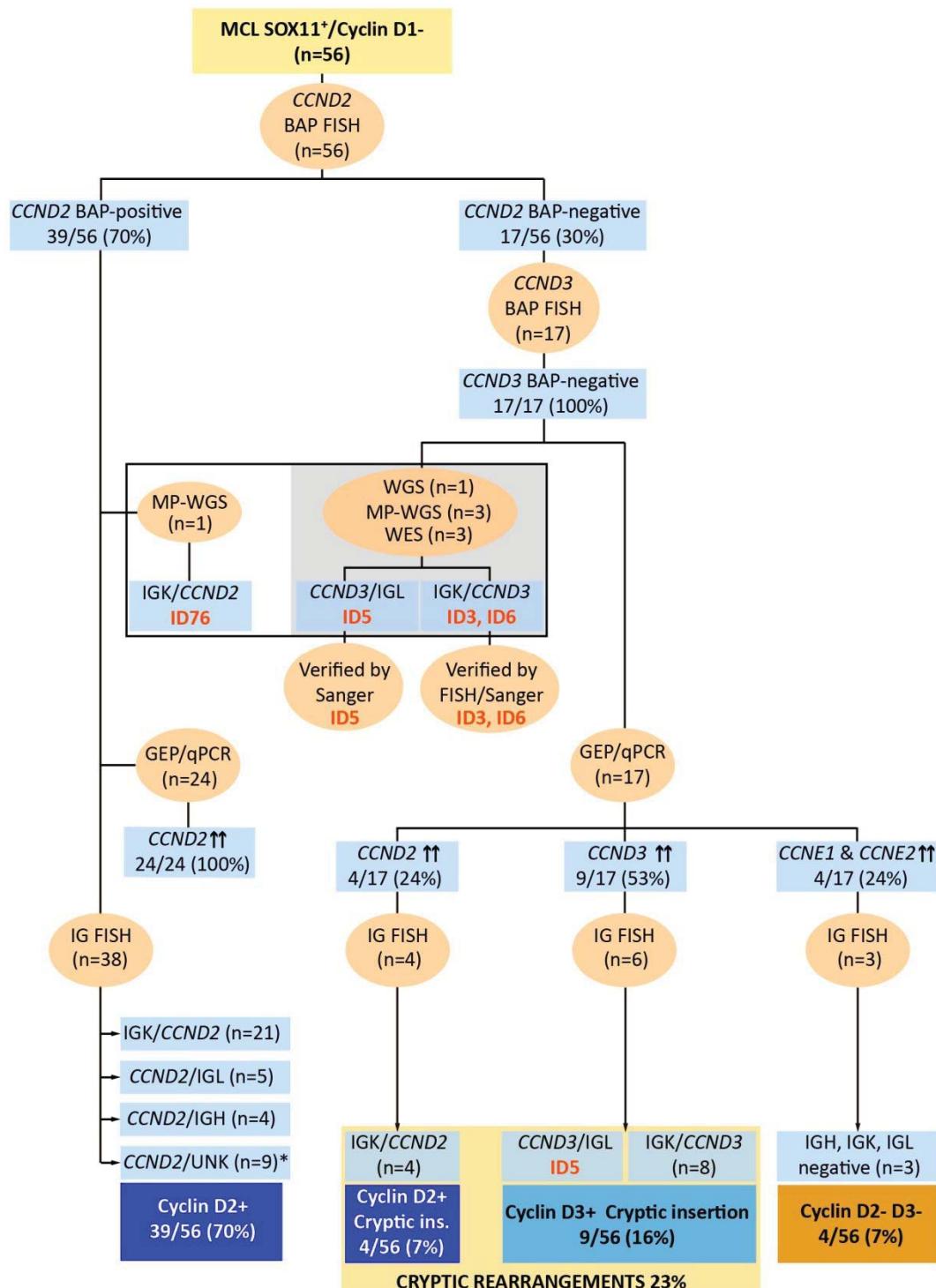
*The selected 7 mutations (in 6 genes) detected by Sidrón and Mutect2 and not by Smufin were verified by Sanger sequencing.

Supplemental Table S9. Copy number alterations of 42 cyclin D1+ MCL cases (47 samples) (hg19)(in excel format).

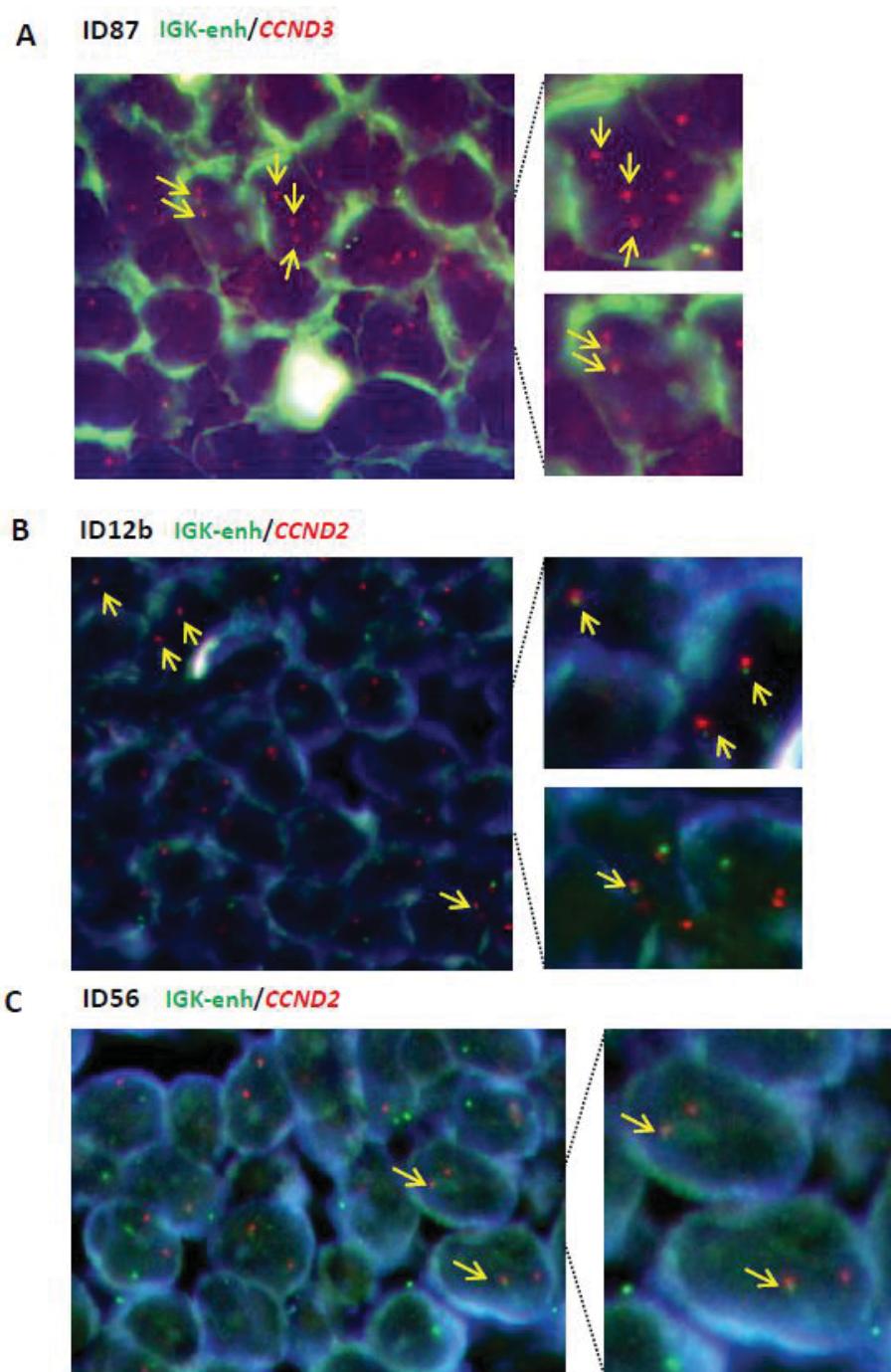
SUPPLEMENTAL FIGURES

Supplemental Figure S1. Schematic representation of the experimental design and cyclin D1- MCL subgroups. Flowchart diagram of cases, techniques, and results. The gray square highlights cases analyzed by NGS that lead to the discovery of the cryptic rearrangements. *In 1/9 cases with CCND2 break no IGH, IGK, IGL FISH was performed to test the partner.

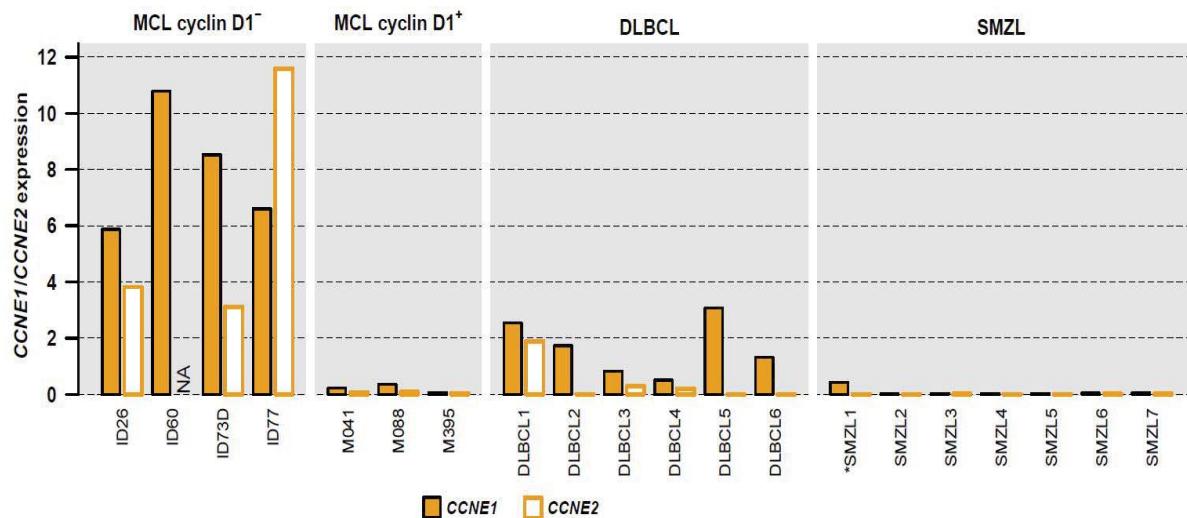
BAP: break-apart probes, IG FISH: FISH experiments to determine the partner gene, MP-WGS: mate-pair whole-genome sequencing, WES: whole-exome sequencing, ↑↑: overexpression.



Supplemental Figure S2. FISH analyses of CCND2/D3 cryptic insertions. (A) Cryptic IGK/ CCND3 in case ID87, 2 or 3 fusion signals were found in each cell, concordant with a gain of CCND3, both by FISH and array. (B-C) Cryptic IGK/CCND2 in cases ID12b and ID56. Fusion probes IGK-enh/CCND3 and IGK-enh/CCND2 were used, with CCND3 and CCND2 labeled in red and IGK-enh in green. Two red and two green signals are detected in normal cells, and yellow arrows highlight the insertion (one red and one small green signals juxtaposed). Magnification of cells with the rearrangement at the right side of each picture (enh: enhancer).

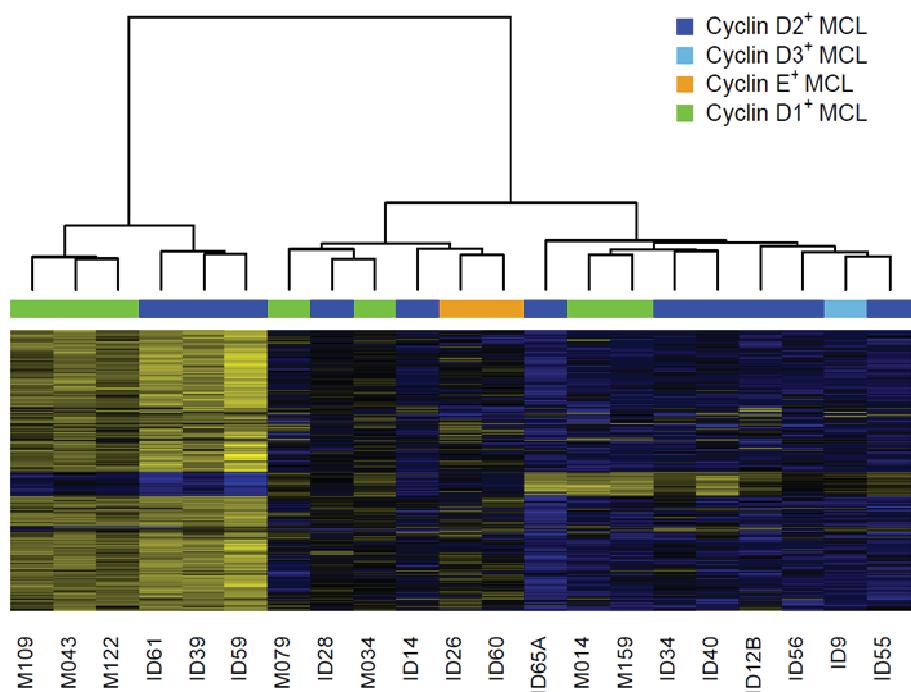


Supplemental Figure S3. CCNE1 and CCNE2 expression in cyclin D1- MCL, blastoid cyclin D1+ MCL, DLBCL, and SMZL. (*SMZL1 corresponds to the case with high protein expression).

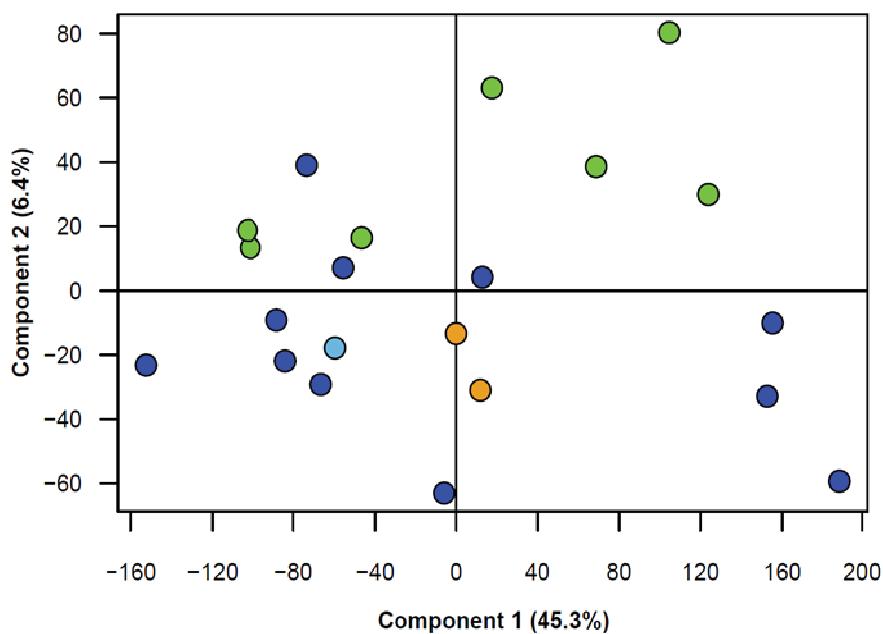


Supplemental Figure S4. Gene expression profiling analysis in cyclin D1- MCL. (A) Heatmap representation comparing cyclin D1⁻ (cyclin D2⁺, cyclin D3⁺, or cyclin E⁺) and conventional cyclin D1⁺ MCL cases using GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays. Each column represents one case and each row one gene. The samples were randomly distributed along the generated clusters. (B) By principal component analysis (PCA) no differences were observed between cyclin D1⁻ and cyclin D1⁺ MCL cases. (C) Differentially expressed genes between cyclin D1⁺ MCL and cyclin D1⁻ MCL.

A



B



C

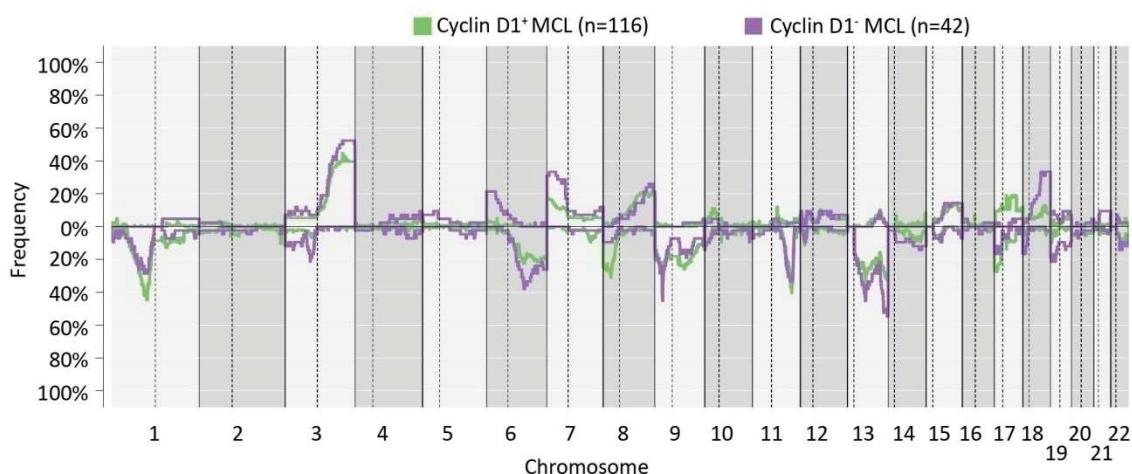
Genes differentially expressed between cyclin D1⁺ MCL versus cyclin D1⁻ MCL.

Probe	Gene	Order	log(FC)	t	P-value	Adjusted P-value
Top 20 genes						
208711_s_at	CCND1	1	4.363	15.112	<0.001	<0.001
222131_x_at	RHOT2	2	0.690	5.200	<0.001	0.244
214498_at	ASIP	3	0.602	5.152	<0.001	0.244
238097_at	GAS6-AS1	4	0.997	4.592	<0.001	0.715
211358_s_at	CIZ1	5	0.435	4.371	<0.001	0.801
220080_at	FBXL8	6	0.638	4.241	<0.001	0.801
227587_at	KRI1	7	0.680	4.232	<0.001	0.801
230664_at	H2BFXP	8	-0.922	-4.212	<0.001	0.801
221679_s_at	ABHD6	9	-0.960	-4.152	<0.001	0.801
225224_at	NOL4L	10	-0.712	-4.151	<0.001	0.801
213660_s_at	TOP3B	11	0.585	4.086	<0.001	0.801
226689_at	CISD2	12	-0.601	-4.065	<0.001	0.801
208461_at	HIC1	13	0.798	4.053	<0.001	0.801
218227_at	NUBP2	14	0.496	3.970	<0.001	0.801
228263_at	GRASP	15	0.480	3.969	<0.001	0.801
1552632_a_at	ARSG	16	-0.659	-3.947	<0.001	0.801
230633_at	TMEM102	17	0.461	3.928	<0.001	0.801
221704_s_at	VPS37B	18	0.876	3.917	<0.001	0.801
221992_at	NPIPBP15	19	0.673	3.881	<0.001	0.801
218909_at	RPS6KC1	20	-0.645	-3.833	<0.001	0.801
Selected genes						
200951_s_at	CCND2	32	-2.541	-3.662	0.001	0.787
204914_s_at	SOX11	3486	-0.626	-1.378	0.182	0.999
211814_s_at	CCNE2	11919	-0.220	-0.537	0.597	0.999
201700_at	CCND3	16302	0.113	0.243	0.810	0.999
213523_at	CCNE1	17607	-0.024	-0.163	0.872	0.999

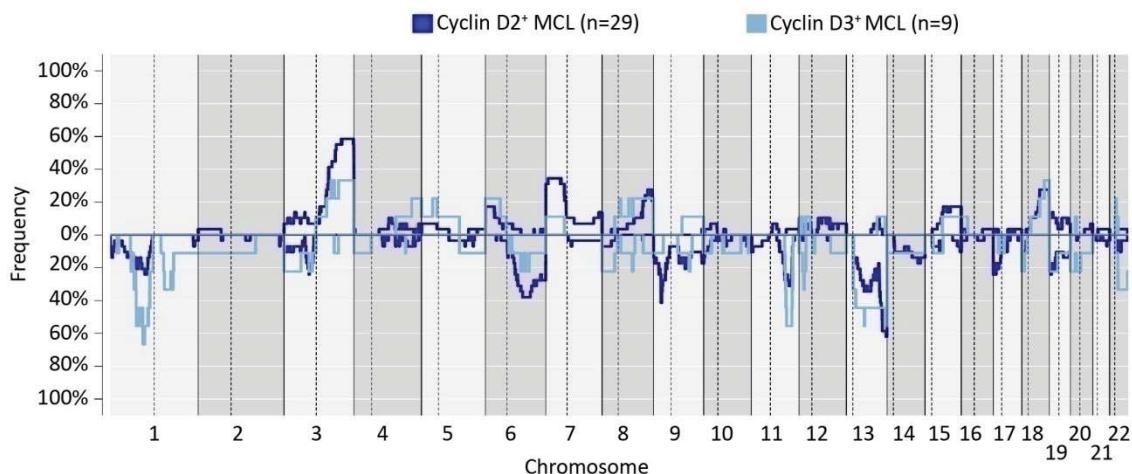
FC, fold-change.

Supplemental Figure S5. Copy number alterations in cyclin D1- MCL. Chromosomes are depicted on the X-axes and the frequency of altered cases is depicted on Y-axes; gains and losses are represented in the upper and lower parts, respectively. **(A)** Comparison of copy number alterations (CNA) between cyclin D1⁻ and cyclin D1⁺ MCL. **(B)** Comparison of CNA between cyclin D2⁺ and cyclin D3⁺ MCL. **(C)** Representation of CNA in 5 cases with 2 different samples (1 synchronous and 4 sequential). Chromosomes are depicted in columns and each row represents one sample. For each pair of samples the time interval is indicated in months and the asterisks highlight the post-treatment samples.

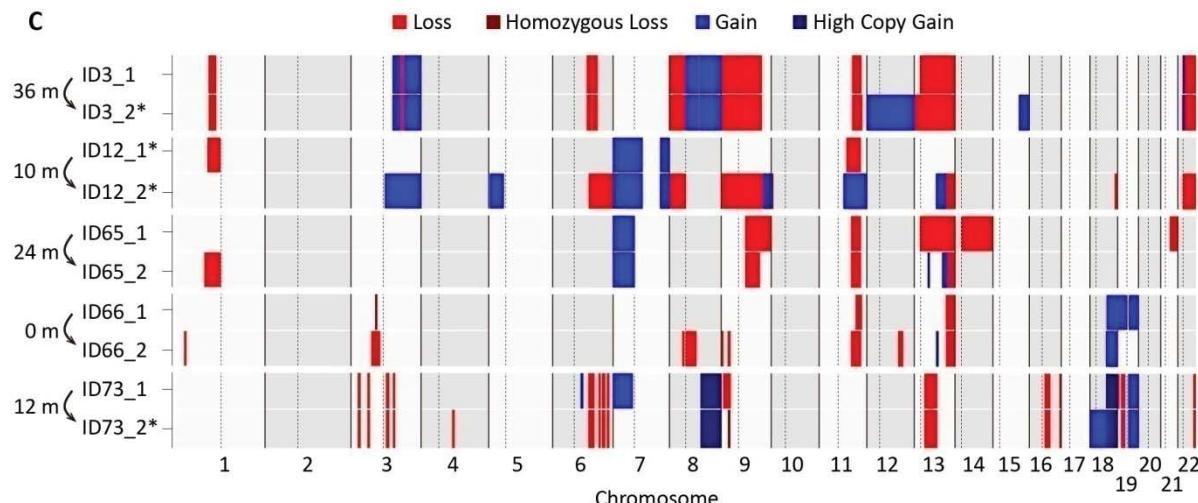
A



B

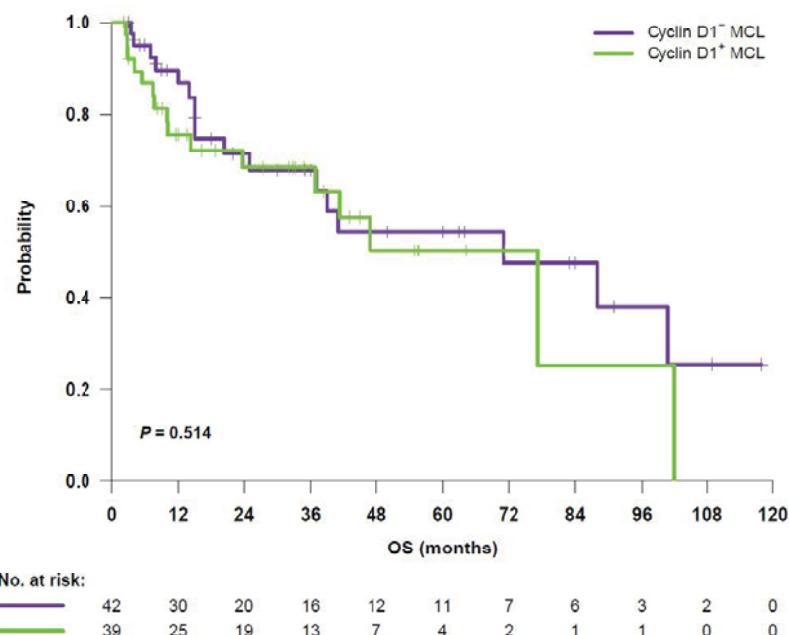


C

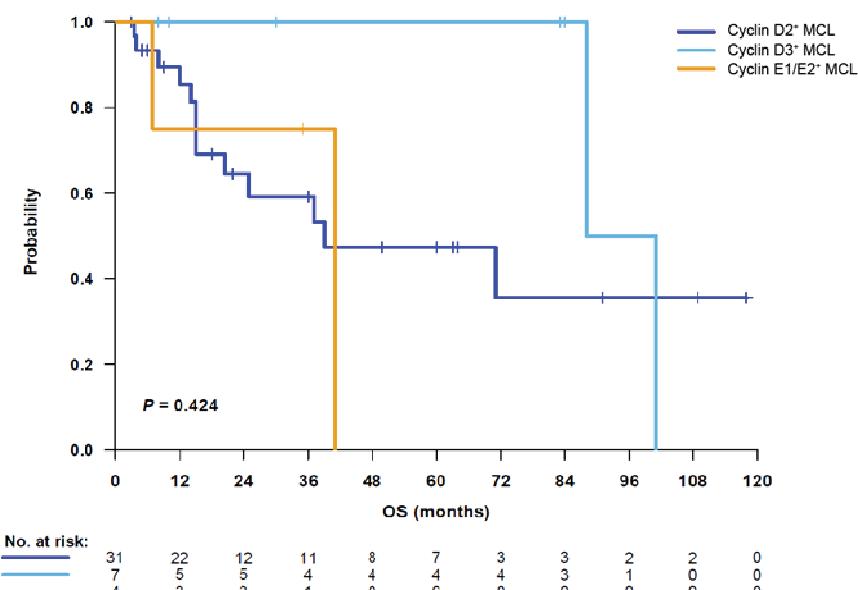


Supplemental Figure S6. Clinical outcome of cyclin D1- MCL patients. (A) Kaplan-Meier curve showing the similar overall survival (OS) of cyclin D1⁺/SOX11⁺ MCL and cyclin D1⁻ MCL patients. (B) Kaplan-Meier curve comparing the OS of cyclin D2⁺ MCL, cyclin D3⁺ MCL, and cyclin E1⁺/E2⁺ MCL patients. The *P*-value was calculated using a Log-rank test.

A

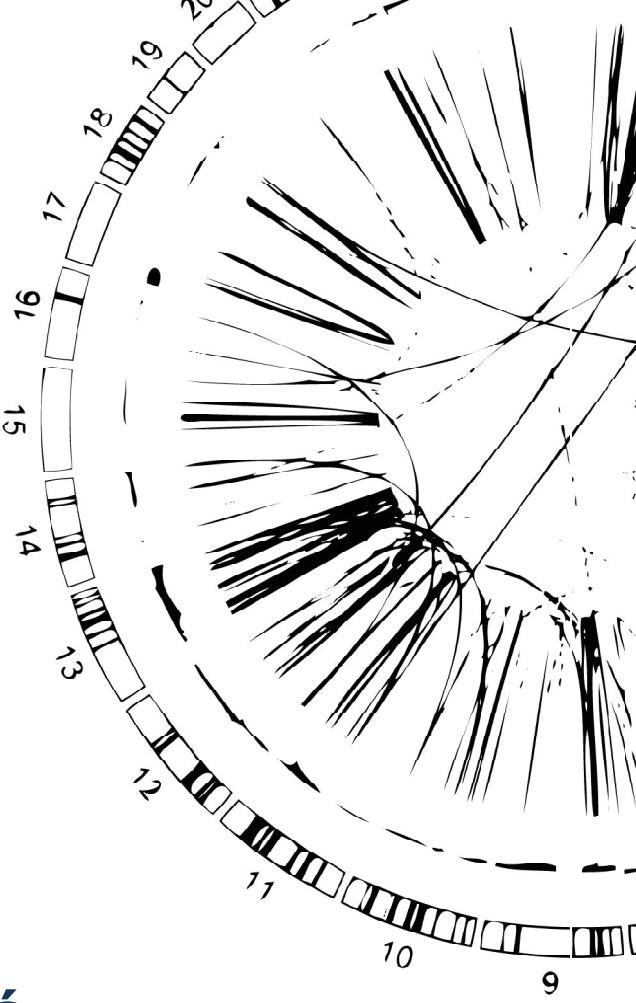


B

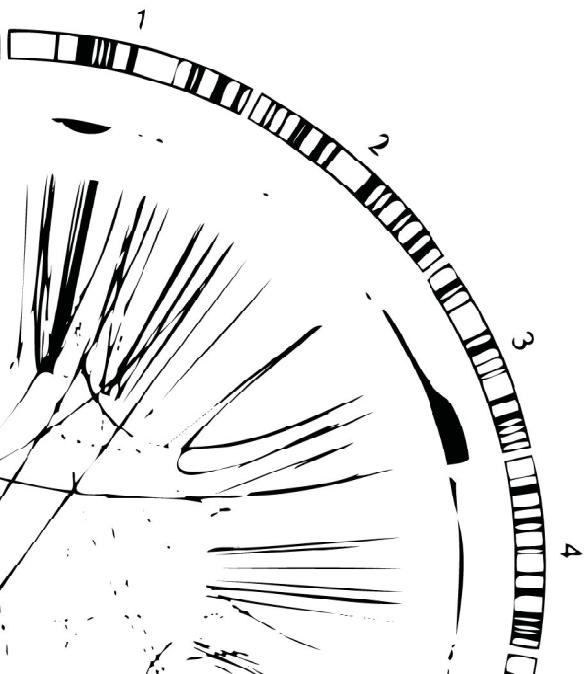


SUPPLEMENTAL REFERENCES

1. Salaverria I, Royo C, Carvajal-Cuenca A et al. CCND2 rearrangements are the most frequent genetic events in cyclin D1(-) mantle cell lymphoma. *Blood* 2013;121:1394-1402.
2. Gesk S, Klapper W, Martin-Subero JI et al. A chromosomal translocation in cyclin D1-negative/cyclin D2-positive mantle cell lymphoma fuses the CCND2 gene to the IGK locus. *Blood* 2006;108:1109-1110.
3. 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;98:2837-2844.



DISCUSSIÓ



En aquesta tesi s'han estudiat principalment les alteracions genètiques de dues neoplàsies limfoides de cèl·lula B: la Leucèmia Limfàtica Crònica (CLL) i el Limfoma de Cèl·lules del Mantell (MCL), dues malalties molt heterogènies, tant molecularment com clínicament. Encara que són molt diferents l'una de l'altra, els reordenaments i alteracions cromosòmiques que presenten les dues malalties tenen una gran importància tant pel diagnòstic com pel pronòstic. D'una banda, la CLL és una malaltia heterogènia poc agressiva, crònica, que presenta diferents mutacions amb una freqüència baixa (<12%). Algunes d'aquestes mutacions, com *TP53*, tot i ser poc freqüents, s'utilitzen com a factor pronòstic en la rutina clínica i es fan servir com a selecció de tractaments personalitzats, utilitzant diferents inhibidors. En CLL també es troben diferents alteracions numèriques amb una freqüència més elevada que les mutacions i amb valor pronòstic. Les primeres alteracions que es van detectar en CLL van ser les deleccions 11q22.3, 13q14, 17p13 i la trisomia 12 gràcies a la tècnica de cariotip. Actualment aquestes quatre alteracions es detecten per FISH realitzant dues hibridacions diferents i es fan servir com a rutina en la clínica, predint mal pronòstic si el cas presenta la deleció 11q22.3 o 17p13, o bon pronòstic si presenta només la deleció 13q14. Diferents estudis van detectar mitjançant array de còpia genòmica que la CLL també podia presentar altres alteracions estructurals i complexitat genòmica, les quals s'associaven a mal pronòstic, però aquestes alteracions no s'utilitzen en rutina clínica per a l'estratificació pronòstica de la malaltia. D'altra banda, el MCL és una malaltia considerada agressiva, que presenta diferents mutacions freqüents i reordenaments estructurals, i que és molt heterogènia. La translocació característica en la malaltia és la translocació $t(11;14)(q13;q32)$ que causa una sobreexpressió de la ciclina D1, és considerada l'alteració oncogènica primària i s'utilitza com a criteri diagnòstic. No obstant, alguns dels casos de MCL, tot i presentar una morfologia i fenotip de MCL, no presenten aquesta translocació primària, ni expressen ciclina D1 però alguns d'ells expressen ciclina D2 o ciclina D3. En el 55% dels casos MCL Ciclina D1-negatius es va poder detectar una translocació dels gens de les immunoglobulines amb la *CCND2*, ja fos la $t(2;12)(p11;p13)$ o la $t(12;22)(p13;q21)$ que juxtaposa la *CCND2* amb les cadenes lleugeres de les immunoglobulines, o la $t(12;14)(p13;q32)$ que juxtaposa la *CCND2* amb la *IGHV*. La resta dels casos MCL Ciclina D1-negatius no es va poder detectar cap translocació que expliqués la sobreexpressió de les ciclines i que pogués ser útil per a un diagnòstic diferencial.

Per tant, en els treballs d'aquesta tesi doctoral s'ha dissenyat una nova plataforma que permet analitzar totes les alteracions genètiques en la CLL, incloent les quatre alteracions principals habitualment detectades per FISH i que sigui útil en la clínica. Finalment també s'han identificat els reordenaments oncogènics primaris que expliquen la sobreexpressió de la *CCND2* i *CCND3* en pràcticament tots els casos MCL Ciclina D1-

negatius. Aquesta tesi doctoral s'ha centrat en l'anàlisi dels reordenaments estructurals i alteracions de còpia gènica mitjançant tècniques de microarrays i NGS combinant-les amb altres tècniques moleculars.

En l'**estudi 1** es va realitzar un estudi genòmic de les CLL, mitjançant microarrays d'alteracions de número de còpies. La tècnica més utilitzada pel diagnòstic en la CLL en les darreres dècades ha estat la tècnica de FISH, seguint el que va publicar Döhner i col·laboradors en el seu estudi (Döhner *et al.*, 2000) on s'analitzaven les deleccions d'11q22.3, 13q14, 17p13 i la trisomia 12. En els darrers anys però, l'ús de microarrays de còpia gènica ha permès detectar altres alteracions menys freqüents que poden aportar informació addicional a les 4 alteracions principals. Les alteracions detectades per array i que vam afegir al nou microarray van ser regions freqüentment alterades en CLL (11q22-q23, 13q14, 17p13), regions focals (2p16.1-p15, 2p24.3, 2q13, 2q36.3-q37.1, 3p21.31, 8q24.21, 9p21.3, 10q24.32 i 18q21.32-q21.33), regions grans (6q14.1-q22.31 i 7q31.33-q33) i les 3 immunoglobulines (IGH a 14q32 i IGK a 2p11). La raó per la qual es van seleccionar aquestes regions focals va ser seleccionar regions on es localitzessin gens que poden estar relacionats amb la CLL, observats en estudis de microarrays on s'analitzaven un gran nombre de mostres. En aquestes regions focals es poden trobar oncogens i gens supressor de tumors com *NMYC* a 2p24, *BCL11A* o *REL* a 2p16.11, *BIM* a 2q13, *SP140* a 2q37.1, *MAP4* a 3p21, *MYC* a 8q24.21, *CDKN2A* a 9p21.3 o *NFKB2* a 10q24 entre d'altres. Una altra decisió per la qual es va optar per dissenyar un microarray de còpia gènica específic per CLL va ser per poder analitzar casos de CLL que analitzant les 4 alteracions principals de CLL per FISH donava un resultat normal, sense cap de les 4 regions alterades. Aquests casos ja es van observar en un estudi l'any 2013 (Mian *et al.* 2013) on van detectar casos de CLL amb FISH normal, però que a l'hora de realitzar microarrays de còpia gènica s'observaven alteracions que provocaven un pronòstic desfavorable. A més, també es va detectar que la complexitat genòmica (nombre elevat d'alteracions detectat per microarrays) i la cromotripsi es trobaven associades a un pitjor pronòstic (Edelmann *et al.* 2012). La complexitat genòmica i la cromotripsi no poden ser detectades per FISH, donat que el FISH és específic d'una o poques regions. No obstant, sí podrien ser detectades mitjançant la tècnica de cariotip, malauradament la realització d'un cariotip requereix cèl·lules en cultiu i les CLL tenen un índex mitòtic baix, cosa que fa que el cariotip sigui una tècnica difícil per ser utilitzada en la clínica. La tècnica de FISH utilitzada com a eina pronòstica que es fa per rutina, només detecta les 4 alteracions principals i no inclou la resta d'alteracions ni la complexitat genòmica. Per aquest motiu en l'**estudi 1** ens vam proposar crear un microarray, el qChipHemo, específic per a les regions recurrents en CLL, incloent les 4 alteracions principals, que pogués detectar complexitat genòmica i que fos útil per a un ús en la clínica.

Al ser un microarray de còpia gènica, les alteracions que es detecten només poden ser translocacions no balancejades, que provoquen pèrdues i guanys. Les translocacions balancejades entre dos cromosomes no comporten cap guany ni pèrdua i per tant, no es poden detectar per microarray. Les translocacions balancejades en CLL com les translocacions de *BCL2* i *BCL3* amb *IGH*, però, són molt rares i tal com es va publicar l'any 2014, aquestes translocacions no tenen efecte pronòstic si no van acompañades de pèrdues de 17p (Baliakas *et al.*, 2014), les quals sí detecta el qChipHemo.

De totes les alteracions analitzades amb el microarray qChipHemo, s'ha trobat que algunes s'associen amb pronòstic. La deleció d'11q s'ha trobat associada a un temps al primer tractament més curt, com ja es va observar l'any 1997 (Döhner *et al.*, 1997) on casos amb la deleció d'11q requerien un tractament abans que els casos sense la deleció. El mateix s'ha observat en casos que presenten 2 o més CNA i com ja s'havia vist en un estudi l'any 2011 presentar 2 o més CNA s'associa a un temps al primer tractament significativament més curt que tenir-me menys de 2 (Ouillette *et al.*, 2011). La complexitat genòmica (6 o més CNA) detectada amb qChipHemo també s'ha trobat associada a una pitjor supervivència. La raó per la qual el número de CNA es troba relacionat tant a un temps al primer tractament com una supervivència més curta podria ser degut a la desregulació de centenars de gens que es dóna quan es succeeix una pèrdua o un guany. La desregulació d'aquests gens pot afectar diferents vies cel·lulars imprescindibles per a un bon funcionament de la cèl·lula, afavorint la proliferació cel·lular del subclon i provocant una selecció positiva envers les altres cèl·lules. El malfuncionament del cicle cel·lular i d'altres vies podrien ser la causa d'un temps al primer tractament i una supervivència més curta. Les cèl·lules, no obstant, tenen mecanismes per a la detecció i eliminació de cèl·lules tumorals, com els gens supressors de tumors. El gen *TP53* és un dels gens supressors de tumors més importants involucrat en diverses vies cel·lulars com l'apoptosi o el reconeixement del dany a l'ADN. No és d'estraryar, doncs, que casos amb delecions a 17p, on es troba localitzat *TP53*, presentin més complexitat genòmica que casos sense la deleció de 17p, i per tant, casos amb 17p també presentin una supervivència menor que casos sense la deleció. *TP53* és el gen important en la regió de 17p donat que tant si una alteració afecta tot el braç de 17p com si l'alteració només afecta el gen *TP53*, s'adquireix inestabilitat cromosòmica i una pitjor supervivència, sobretot en CLL amb IGHV no mutades (Dicker *et al.*, 2009; Delgado *et al.*, 2014).

En el nostre treball s'ha observat que el 4,4% del casos de CLL presentaven cromotripsi. Aquests casos presenten una pitjor supervivència com ja es va veure l'any 2012 en la publicació d'Edelmann i col·laboradors on detectaven mitjançant microarrays de còpia

gènica 7 casos amb cromotripsi i 12 més amb *cromotripsy-like* amb una pitjor supervivència i un menor temps lliure de progressió (Edelmann *et al.*, 2012). La cromotripsi també es va poder seguir en un cas on es va realitzar WGS i microarrays de còpia gènica en 4 mostres seqüencials durant 11 anys (Bassaganyas *et al.*, 2013). Es va observar que la cromotripsi no era un esdeveniment inicial, que es troava en subclon el qual desapareixia amb el tractament. Dels casos CLL amb cromotripsi del nostre estudi, s'ha observat que un 38% presenten la cromotripsi en el cromosoma 5. La regió de 5p, on es localitza el gen *TERT*, es troava guanyada, amplificada o reordenada. *TERT* és la transcriptasa reversa de la telomerasa i està relacionada amb el manteniment dels telòmers dels cromosomes. En cada divisió cel·lular els telòmers dels cromosomes no es repliquen completament, fragments dels extrems finals dels telòmers es perden i, per tant, pateixen un escurçament a cada divisió cel·lular. La telomerasa es troba inactivada en cèl·lules adultes, fet que provoca que els telòmers no puguin mantenir ni duplicar els seu tamany. L'escurçament dels telòmers i la desprotecció dels extrems dels cromosomes pot donar lloc a unions de cromosomes entre ells i a esdeveniments com la cromotripsi, i per tant, donant lloc a més inestabilitat cromosòmica en les successives divisions cel·lulars. Perquè no es donin reordenament la cèl·lula entra en apoptosis quan detecta que els telòmers s'han escurçat i els cromosomes estan desprotegits. La cromotripsi que afecta al cromosoma 5 en CLL i que provoca guanys i reordenaments del gen *TERT*, incrementa l'activitat de la telomerasa i això podria provocar un allargament dels telòmers, protegint d'aquesta manera les cèl·lules que han patit cromotripsi i evitant que els mecanismes d'apoptosi detectin aquest subclon cel·lular com a nociu. L'increment de l'activitat de la telomerasa, doncs, podria estar protegint al subclon cel·lular i contribuïnt a la limfomagènesi i als reordenaments cromosòmics catastròfics.

La comparació entre qChipHemo, les tècniques de FISH i els arrays SNP6.0 han permès observar els avantatges del qChipHemo. Les alteracions que es poden detectar amb les tres tecnologies diferents presenten uns resultats molt similars. En la comparació entre el qChipHemo i el FISH en la detecció de les deleccions a 17p es va observar, però, que hi havia casos que la delecio només s'observava per FISH, tot i que es troaven en subpoblacions (<17% de les cèl·lules). No obstant, la supervivència d'aquests casos era molt similar a la supervivència de casos sense la delecio de 17p. Així doncs, i encara que la resolució qChipHemo no sigui capaç de detectar alteracions de 17p en subpoblacions tant petites, les deleccions en 17p amb aquest petit tamany de població no tenen efecte pronòstic. El fet que qChipHemo no detecti les petites subpoblacions amb deleccions de 17p sense factor pronòstic podria ser degut a un emmascarament del subclon majoritari sobre el subclon amb 17p perdut. Ara bé, en un futur el percentatge de població amb la delecio de 17p podria augmentar, sobretot per la pressió selectiva després de ser tractats amb

quimioteràpia convencional tipus FCM (Bosch *et al.*, 2002), la qual sí es podria detectar amb qChipHemo. Per tant, en casos sense 17p proposariem realitzar un altre cop qChipHemo en els mesos següents. Una altra diferència entre el FISH i el qChipHemo és el nombre d'alteracions que es poden analitzar a la vegada. Mentre que les tècniques de FISH utilitzades per al pronòstic de la CLL només detecten les 4 alteracions principals (deleció 11q22.3, 13q14, 17p31 i trisomia 12) que es van proposar l'any 2000 amb l'estudi de Döhner, i realitzant dos experiments d'hibridació diferents, qChipHemo permet detectar en un sol experiment aquestes 4 alteracions, alteracions freqüents en CLL, mesurar la complexitat genòmica, identificar esdeveniments cromotíptics i fins i tot CNN-LOH, i a més, permet definir molt millor els guanys i les pèrdues i els punts de trencament d'aquestes alteracions numèriques. Els arrays SNP6.0 també permeten detectar totes aquestes alteracions però el qChipHemo es focalitza només en les alteracions freqüents en CLL augmentant la densitat de sondes en les regions d'interès. La comparació entre els diferent microarrays és molt bona, no obstant, a vegades hi ha diferències en els resultats degut a la densitat de sondes de cada microarray i sobretot en la subclonalitat de l'alteració, com es va observar en 2 casos, on en un cas es detectava una pèrdua homozigota quan per SNP6.0 només s'observava la pèrdua d'una còpia i en l'altre cas qChipHemo detectava la pèrdua en subclon mentre que SNP6.0 no la detectava. En l'estudi 1 també s'han realitzat dues versions de qChipHemo. La dues versions del microarray tenen la mateixa resolució i sensibilitat cobrint zones freqüentment alterades i fins i tot gens interessants en les neoplàsies limfoides. No obstant, la segona versió ens permet identificar 3 regions més (2q13 cobrint *BUB1*, *ACOXL* i *BCL2L11*; 3p21.21 cobrint *MAP* i *SETD2*, i 10q24.32 cobrint *NFKB2*), freqüentment alterades i publicades i procedents del consorci ICGC (Puente *et al.*, 2015), i com a novetat 5 regions de LOH, 3 de les quals focalitzades en les 3 regions més freqüentment alterades i amb significat pronòstic (11q, 13q i 17p). Així doncs, utilitzant qChipHemo v3.0 podem detectar més alteracions i LOHs recurrents en CLL que utilitzant qChipHemo v1.0.

L'ús dels microarrays pel diagnòstic com per l'estratificació pronòstica de malalties ja està en ús i comença a guanyar força en el diagnòstic de diferents càncers. Han estat molts els estudis que han realitzat microarrays de còpia gènica per estudiar CLL i que proposaven que s'utilitzessin en la clínica, no obstant això, cap d'ells ha arribat mai a utilitzar-se per rutina. Tant en el 2004 com en el 2008 es van realitzar microarrays de CGH mitjançant BAP/PAC (Schwaenen *et al.*, 2004; Patel *et al.*, 2008). En aquests microarrays no s'estudiava tot el genoma sinó regions cromosòmiques concretes on s'havien localitzat alteracions en neoplàsies limfoides de cèl·lula B, sobretot en CLL. Es va observar que tot i la baixa resolució que tenien aquestes plataformes, tenien una alta sensibilitat i especificitat

semblant a la tècnica de FISH. En el 2009 es va realitzar un microarray Agilent 4*44K amb regions específiques per CLL cobertes de sondes amb una elevada densitat (Sargent *et al.*, 2009). Tot i així, la sensitivitat del microarray comparat amb el FISH era baix davant alteracions en subpoblacions. En el 2011 es van realitzar dos estudis on utilitzaven BAC arrays pel pronòstic de la CLL (Kolquist *et al.*, 2011; Schultz *et al.*, 2011). En els dos estudis, la resolució en la deleció 13q14, típica en CLL, era massa baixa: en l'estudi de Kolquist la regió coberta era massa petita i molts casos amb alteració a 13q s'escapaven de la detecció, mentre que en l'estudi de Shultz la cobertura de sondes en la regió de 13q14 era massa baixa i les delecions no es detectaven correctament. En l'estudi de Schultz, a més, la regió d'ATM tampoc estava ben coberta i moltes pèrdues d'ATM tampoc es detectaven correctament. Finalment el 2014, un altre estudi va publicar un array Agilent 4*44K que cobrien moltes alteracions recurrents en CLL i publicava a més, els guanys de 2p, 3q i 8q i les pèrdues de 8p com a regions amb factor pronòstic (Houldsworth *et al.*, 2014). Malauradament, aquesta publicació no comparava el microarray amb els resultats de FISH. En l'**estudi 1**, presentem la plataforma qChipHemo, un array de CGH Agilent 8*60K, un array que permet analitzar 8 casos en un sol experiment i, comparat amb altres plataformes, conté moltes més sondes per regió. Però, a més d'una millor cobertura de tot el genoma, les regions freqüentment alterades també es troben molt més cobertes i es capaç de detectar zones amb LOH. Usant aquests microarray es poden detectar regions freqüentment alterades, regions que ja es coneixia que tenien efecte pronòstic i, a més, es pot detectar cromotripsi i complexitat genòmica, dos esdeveniments que també tenen efecte pronòstic en la CLL. En el nostre estudi també hem comparat l'array qChipHemo amb la tècnica de FISH i hem observat que és igual d'específica i té més resolució. qChipHemo, a més, no requereix de cèl·lules en cultiu, com és el cas del FISH, i requereix molt poc ADN tumoral. qChipHemo, a més, s'analitzen una gran bateria d'alteracions en un sol experiment, mentre que el FISH requereix dos experiments per analitzar 4 alteracions. També cal destacar que l'anàlisi de la tècnica de FISH és un ànàlisi subjectiu, el resultat de la qual podria ser diferent segons la persona que l'anàlitza i es necessita del comptatge de com a mínim 200 nuclis per a cadascuna de les quatre alteracions. L'anàlisi dels arrays és objectiu i automatitzat i per tant, es minimitza la diferència d'anàlisi entre persones diferents.

Tot i que fins al moment no s'ha utilitzat el qChipHemo en la rutina clínica, creiem que seria una molt bona idea utilitzar el microarray, donat que la resolució i especificitat és molt més bona que la tècnica rutinària FISH i aquests resultats han estat ja comprovats per molts estudis diferents. Creiem que aquest microarray, observant tots els avantatges que té davant de tècniques moleculars més antigues i amb menys resolució i especificitat, podria ser usat en altres tipus de neoplàsies de cèl·lules B limfoides, utilitzant el mateix microarray

o cobrint amb més sondes aquelles regions d'interés per a cada neoplàsia limfoide. La tècnica de FISH només permet analitzar alteracions específiques les quals prèviament es coneix la seva localització específica i només una alteració concreta per experiment.

L'estudi 1 ens ha permès observar com un microarray a la carta de CNA permet analitzar alteracions de còpia gènica en diferent regions del genoma, en un sol experiment i sense la necessitat de saber *a priori* la posició de les alteracions, com és el cas de la tècnica de FISH. L'ús de qChipHemo permetrà millorar el pronòstic de les CLL, utilitzant no només les 4 alteracions principals que s'analitzen en FISH sinó analitzant altres regions alterades, complexitat genòmica i cromotripsi (Figura 32).

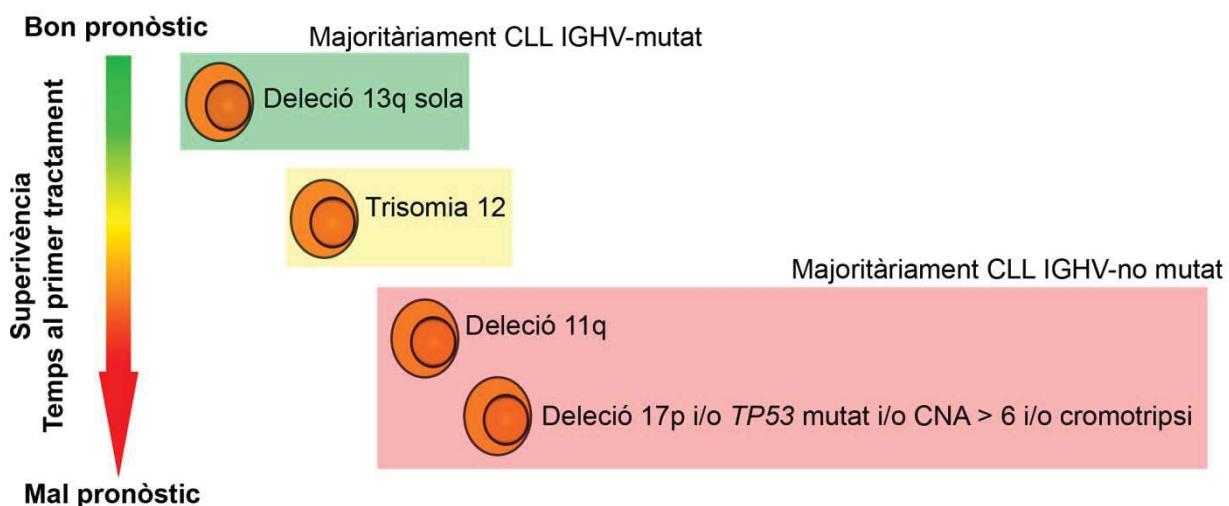


Figura 32. Model de pronòstic en la CLL

L'ús de la tècnica de FISH, doncs, requereix d'un coneixement *a priori* de la regió que es vol analitzar. Si l'alteració no es troba exactament en la regió analitzada no es detectarà cap alteració. El MCL, una neoplàsia limfoide de cèl·lula B, es caracteritza per la translocació oncogènica primària t(11;14)(q13;q32) que juxtaposa CCND1 al costat de IGHV, provocant una sobreexpressió de la ciclina D1. Aquesta translocació s'utilitza com a criteri diagnòstic i normalment es detecta per cariotip i FISH. Un subgrup de MCL no sobreexpressen ciclina D1 però sí ciclina D2 o D3, anomenats MCL ciclina D1-negatius, i es va observar que la meitat dels casos que sobreexpressaven ciclina D2 presentaven una translocació que explicava la sobreexpressió. Malauradament no s'havia trobat cap explicació per la sobreexpressió i de les ciclines D2 i D3 en els altres casos amb les tècniques moleculars fins ara utilitzades i que pogués ser utilitzada per a un diagnòstic diferencial. L'estudi 2, doncs, pretén estudiar els MCL Ciclina D1-negatius, analitzant els casos mitjançant tècniques de NGS per tal esbrinar si aquests casos presenten alteracions primàries oncogèniques que per tècniques moleculars convencionals com FISH o cariotip no

s'han pogut observar. L'any 2005 es va publicar un estudi de casos MCL sense sobreexpressió de *CCND1*, un gen necessari per a la patogènesi de la malaltia i fins al moment necessari per al diagnòstic de la malaltia, donat que no era del tot clar si els casos MCL Ciclina D1-negatius es podien considerar MCL (Fu *et al.*, 2005). L'estudi es va realitzar utilitzant perfils d'expressió gènica (GEP) i es va poder observar que els 6 casos MCL Ciclina D1-negatius presentaven un perfil d'expressió idèntic als MCL i molt diferent a altres neoplàsies limfoides de cèl·lula B. Ara bé, els MCL expressaven *CCND1* mentre que els MCL Ciclina D1-negatius no l'expressaven, però, alterternativament expressaven *CCND2* o *CCND3*, encara que sense cap reordenament apparent. En l'**estudi 2** de la tesi doctoral, s'han analitzat 56 casos MCL Ciclina D1-negatius, 3 dels quals ja inclosos en l'estudi de Fu i col·laboradors. Aquests 56 casos es troben ben caracteritzats i cap d'ells presenta la translocació *t(11;14)(q13;q32)* típica dels MCL. Mitjançant les tècniques de GEP i qPCR s'ha detectat el que ja havia observat Fu i col·laboradors l'any 2005: cap dels casos presenta expressió de *CCND1* però dels 56 casos, la majoria sobreexpressa ciclina D2, 9 casos sobreexpressen ciclina D3 i 4 casos no expressen cap ciclina D estudiada però sí que expressen ciclina E1 i ciclina E2 concomitants, dos sobreexpressions que fins al moment no s'havien observat en els MCL. Que els 56 MCL Ciclina D1-negatiu no expressin *CCND1*, podria fer pensar que hi hagut un mal diagnòstic, malclassificant aquests casos amb el que podrien ser casos DLBCL o altres limfomes no hodgkin de cèl·lula B petita. No obstant, en l'experiment de GEP que vam realitzar es va observar que els MCL Ciclina D1-negatius presentaven el mateix perfil d'expressió que el MCL. A més, els 56 casos MCL Ciclina D1-negatius del nostre estudi tenen una morfologia característica dels MCL i expressen CD5 i SOX11, marcadors molt específics de MCL. Només un sol cas no expressa CD5; aquest cas però presenta un morfologia clàssica de MCL, expressa SOX11 i sobreexpressa *CCND3*. A més, té un perfil de CNA amb alteracions típiques de MCL com pèrdues d'1p i 11q. Aquestes característiques, segons la classificació de neoplàsies hematològiques de la WHO són suficients per poder classificar aquest cas com a MCL, però a més ja s'han descrit casos MCL CD5-negatius. En l'estudi de Mozos i col·laboradors, l'any 2009 van observar que els MCL Ciclina D1-negatius expressaven SOX11 de manera similar als MCL (Mozos *et al.*, 2009). Tant l'estudi de Mozos com l'estudi de Zeng i col·laboradors l'any 2012 van observar que l'expressió de SOX11 només s'observava en els MCL, els MCL Ciclina D1-negatius, en un 20% dels Limfomes de Burkitt i en un 80% de les leucèmies limfoblàstiques agudes, però no es detectaven en cap altre Limfoma no-Hodgking de cèl·lula B (Zeng *et al.*, 2012). Així doncs, aquests resultats suggereixen que el MCL Ciclina D1-negatius formen part d'un subgrup de MCL. Tots els MCL Ciclina D1-negatius de la nostra sèrie, al expressar SOX11, soLEN ser aggressius i tenir una supervivència baixa com ja es va observar en els estudis de Mozos i Zeng, on els casos MCL tant Ciclina D1-positius com Ciclina D1-negatius amb

expressió de SOX11 presentaven un pitjor pronòstic que el MCL Ciclina D1-positius que no l'expressen. Fins al moment, no s'ha observat cap MCL Ciclina D1-negatiu sense expressió de SOX11, fet que fa pensar que SOX11 és un marcador essencial i útil per diagnosticar els MCL Ciclina D1-negatius.

Un estudi més recent realitzat pel nostre grup va analitzar 40 casos MCL Ciclina D1-negatius amb morfologia i immunofenotip de MCL i expressió de SOX11 (Salaverria *et al.*, 2013). En aquest estudi es va realitzar FISH de les immunoglobulines IGH, IGK i IGL amb la CCND2 i es va observar que el 55% dels casos MCL Ciclina D1-negatius presentaven les translocacions IGK/CCND2 (45%), CCND2/IGH (14%), CCND2/IGL (23%) i 18% de casos amb translocació a la CCND2 però amb una juxtaposició desconeguda. També es va analitzar la possible mutació en les zones de foforil·lació de les ciclines D. La fosforil·lació de la ciclina provoca la degradació de la proteïna, però quan aquestes zones de fosforil·lació estan mutades la ciclina no es degrada i la proteïna s'acumula provocant una major activitat. Les mutacions de les zones de foforil·lació en les ciclines podrien representar una alternativa a la translocació en el 45% dels casos MCL Ciclina D1-negatius sense translocació, però en l'estudi de Salaverria i col·laboradors tampoc es va observar cap mutació en cap de les ciclines estudiades. En **l'estudi 2** vam realitzar FISH *break-apart* de la CCND2 en els nostres 56 casos i vam observar que el 70% dels casos MCL Ciclina D1-negatius presentava un reordenament en la CCND2, un 15% major a l'estudi previ. El 30% restant dels casos, no presentaven cap reordenament de la CCND2, però tampoc es va observar cap reordenament de la CCND3 quan es va realitzar el FISH *break-apart* de la CCND3.

Per tal d'analitzar els casos MCL Ciclina D1-negatius que no presentaven ni reordenaments de la CCND2 ni de la CCND3 observat per FISH, es va realitzar un estudi més exhaustiu mitjançant tècniques de NGS. Les tècniques de NGS ens permeten detectar alteracions balancejades i no balancejades que es poden trobar en tot el genoma encara que siguin de pocs parells de bases. L'anàlisi de 2 MP-WGS va permetre observar un reordenament similar: una inserció de la regió *enhancer* de les IGK al costat de la CCND3. Aquesta inserció críptica no s'havia detectat amb la tècnica de FISH *break-apart* degut al petit tamany (26,6 i 27,3 Kb) que s'inserta al costat de la CCND3 i degut a la localització de les sondes *break-apart* en la CCND3. Aquestes dues sondes flankejen el gen CCND3 i només es podrà observar un reordenament de CCND3 amb un altre cromosoma. En MCL, quan parlem de la translocació oncogènica primària de la IGH o de les cadenes lleugeres IGK o IGL, aquestes regions es localitzen senceres al costat de CCND1 o CCND2. Aquesta translocació es pot observar per FISH *break-apart*, donat que cada sonda es troba localitzada a un costat del gen i el reordenament de tot un braç del cromosoma sencer

provoca que una de les sondes es localitzi en un altre cromosoma. El petit tamany de les insercions críptiques i el fet que no es dóna cap reordenament amb un altre cromosoma no permeten que puguin ser detectades amb les sondes de FISH *break-apart*. També vam poder observar que no es requeria del reordenament de tota la regió de les immunoglobulines. Mitjançant experiments de l'estat de la cromatina de cèl·lules B normal madures realitzats per altres grups col·laboradors (Beekman *et al.*, 2018) i la línia cel·lular de referència GM12878 que es troba al servidor UCSC, vam poder observar que la petita regió que s'insertava *upstream* (a 5' del gen) de CCND3 era la regió específica d'*enhancer* de la IGK, que provocava la sobreexpressió de CCND3. Per tal d'assegurar que aquesta regió és suficient per a la sobreexpressió del gen seria necessari realitzar estudis funcionals mitjançant una inserció *in vitro* de la regió *enhancer* de les immunoglobulines en una línia cel·lular al costat de CCND3 i observar com canvia l'expressió del gen. L'anàlisi de WES va permetre detectar un altre cas que presentava una inserció d'una regió *enhancer* de la cadena lleugera IGL *downstream* (a 3' del gen) de la CCND3. L'ús de WES per a l'anàlisi de reordenaments estructurals no és comú. El WES és una tècnica utilitzada per a l'anàlisi de mutacions i petites insercions i deleccions codificant, donat que el WES només cobreix zones exòniques i reguladores. Ara bé, com tots els exons i regions propers als exons estan seqüenciats, el WES pot detectar reordenaments estructurals on algun dels dos punts de trencament es donin en exons o propers als exons. En l'estudi de Yang i col·laboradors l'any 2016 ja van analitzar més de 4500 WES de 15 tumors diferents per detectar gens de fusió i reordenaments estructurals (Yang *et al.*, 2016). L'inserció críptica de l'*enhancer* detectada per WES en el cas de MCL, però, es va veure que es localitzava *downstream* de CCND3. El genoma no es troba lineal en el nucli cel·lular sinó que es troba compactat en forma de cromatina. Estudis en la cromatina han pogut observar que el plegament de la cromatina presenta una conformació tridimensional provocant que regions del genoma, tot i estar allunyats, interaccionin entre ells i provoquin una regulació dels gens en zones concretes (Tang *et al.*, 2017). Així doncs, i com ja es va descriure en una publicació (Pennacchio *et al.*, 2013), l'*enhancer* es pot trobar a distàncies molt grans del gen que regula i tant es poden trobar en regions *upstream* o *downstream* del gen. Per tant, és clar que els dos enhancers críptics que es van detectar per MP-WGS i que es troben *upstream* de CCND3 sobreexpressen el gen, però el fet que l'*enhancer* críptic trobat per WES es localitzi a la regió *downstream* del gen CCND3 no significa que no pugui estar sobreexpressant CCND3. De fet, l'any 1995, Mautner i col·laboradors van detectar dos *enhancers* que es trobaven a la regió *downstream* del gen MYC i que provocaven una sobreexpressió d'aquest (Mautner *et al.*, 1995). Més recentment, Li i col·laboradors també van publicar un model murí on un *enhancer* que es trobava *downstream* del gen *Bcl11b*, un gen específic de cèl·lula T necessàries per l'hematopoiesis, controlava la seva regulació (Li *et al.*, 2013). Una bona idea

seria realitzar estudis funcionals per observar que l'introducció de l'*enhancer* tant *upstream* com *downstream* de CCND3 donen lloc a la sobreexpressió del gen.

Per a la detecció de les insercions críptiques dels *enhancers* es van dissenyar unes sondes de fusió específiques (incloent la regió de l'*enhancer* de la IGK) utilitzant la tècnica de FISH convencional. D'aquesta manera es van confirmar les insercions críptiques trobades per les tècniques de NGS i a més vam detectar que el 16% dels casos MCL Ciclina D1-negatius presentaven reordenaments de la CCND3, 1 i 8 casos amb inserció críptica de l'*enhancer* de les cadenes lleugeres IGL i IGK, respectivament, però cap amb IGH. Tots els casos que presenten una inserció críptica propera al gen CCND3 presenten altos nivells d'aquest gen, mentre que els casos amb reordenaments en el gen CCND2 presenten nivells elevats de CCND2. Aquests resultats fan pensar que, el fet que CCND3 formi part dels gens de les ciclines D com la CCND1 i la CCND2 i que l'inserció críptica de l'*enhancer* provoca una sobreexpressió de la CCND3 com ho fan les translocacions de les immunoglobulines amb les altres dos ciclines, aquestes insercions poden ser un mecanisme alternatiu molecular a les translocacions de CCND1 i CCND2. Les translocacions de CCND3 en neoplàsies limfoides de cèl·lula B són rares però ja s'havia publicat algun cas. En aquests anys s'han realitzat diferents estudis on s'han detectat casos amb translocacions de CCND3/IGH, les quals totes elles es van detectar mitjançant citogenètica i FISH (Solé *et al.*, 2000; Sonoki *et al.*, 2001; Watanuki *et al.*, 2009; Wren *et al.*, 2017). En aquests 4 estudis es van analitzar diferents casos de SMZL, Limfoma esplènic de limfòcits vellosos, DLBCL i Limfoma de cèl·lules B de baix grau i es van detectar translocacions de la CCND3/IGH. Donat que alguns dels casos amb la translocació també expressen CD5, tenen morfologia blastoïde, amb afectació leucèmica i esplènica i presenten les IGH no mutades, podria fer pensar que el diagnòstic d'aquests casos no és correcte i podrien representar casos MCL ciclina D1-negatius amb CCND3 reordenat. No obstant això, s'hauria d'analitzar l'expressió de SOX11 per tal de corroborar que els casos amb la translocació de la CCND3 són realment MCL. Les translocacions de CCND3 en casos de MCL Ciclina D1-negatius, doncs, poden ser una alteració primària oncogènica alternativa a les translocacions de CCND1 i CCND2. El 2008 ja es va publicar un cas de MCL Ciclina D1-negatiu en el qual mitjançant FISH i cariotip es va poder detectar la translocació recíproca CCND3/IGH (Wlodarska *et al.*, 2008). Donat que la translocació era recíproca, l'alteració es va poder observar gràcies al cariotip i FISH amb sondes convencionals. En els casos de l'estudi 2, les translocacions CCND3/IGK-IGL no es van poder detectar per FISH amb sondes *break-apart* donat que l'inserció de l'*enhancer* de les IGK o IGL, al ser una regió petita i l'*enhancer* no prové d'un reordenament d'un cromosoma sinó que és una inserció que no es pot veure per *break-apart*. És per això que la detecció de les insercions CCND3/IGK-IGL es va realitzar

mitjançant tècniques NGS que permet la detecció d'alteració a resolució de parells de base, i un cop sabuda la regió exacta que s'insertava, vam poder detectar per FISH convencional utilitzant sondes específiques de la regió. Com es pot observar en les publicacions esmentades, tot els casos amb reordenaments de *CCND3* publicats es donen amb IGH i fins l'estudi 2 no es va trobar cap neoplàsia limfoide humana amb un reordenament de la *CCND3* i les cadenes lleugeres de les immunoglobulines. No obstant això, en DLBCL caní sí es va observar la translocació *CCND3/IGK* (Ulvé *et al.*, 2017). L'estudi especifica els dos punts de trencament en el cromosoma 17 caní on es localitza el gen *IGK* que es reordena amb el cromosoma 12 on es localitza *CCND3*. Es va observar que la translocació és funcional, la ciclina D3 es sobreexpressa i es va comprovar per mRNA i per proteïna.

En l'estudi de Salaverria i col·laboradors (Salaverria *et al.*, 2013) es van detectar que el 55% dels casos MCL Ciclina D1-negatius presentaven una translocació de la *CCND2* amb la IGH, IGK o IGL. En l'estudi 2 vam observar que el 70% dels casos MCL Ciclina D1-negatius presentaven la translocació de *CCND2* amb alguna de les immunoglobulines tot i que hi havia una preferència per les cadenes lleugeres i sobretot per la IGK (83% de casos amb reordenaments de la IGK i 17% amb la IGL). Totes aquestes alteracions es van poder observar mitjançant tècniques de FISH amb sondes convencionals i fins i tot en un cas es va poder observar el punt de trencament exacte de *CCND2* i IGK mitjançant la tècnica de MP-WGS. Els casos amb sobreexpressió de *CCND2* però que no presentaven cap reordenament observat per FISH *break-apart* va fer pensar que, com en els casos amb sobreexpressió de *CCND3*, la *CCND2* es podria estar sobreexpressant per una inserció d'un *enhancer*. Mitjançant sondes específiques de FISH, doncs, es van poder observar 4 casos que presentaven insercions de l'*enhancer* IGK proper a la *CCND2* augmentant d'aquesta manera el percentatge de casos amb *CCND2* reordenat al 77%. Per qPCR es va poder observar que els nivells d'expressió en els casos amb l'inserció d'IGK proper a *CCND2* eren similars als casos que presentaven una translocació, fet que fa pensar que les insercions dels *enhancers* de les cadenes lleugeres de les immunoglobulines també són una alternativa a les translocacions recíproques convencional per a la sobreexpressió de *CCND2* i que, per tant, no es requereix del reordenament de tota la immunoglobulina, només amb una regió d'*enhancer* ja és suficient per a la sobreexpressió de la *CCND2*.

La tècnica de MP-WGS estudia tamans grans d'inserts entre les dues lectures de seqüència, i a més, els tamans d'insert són de longitud variable (entre 6 i 12 Kb). Aquest fet i juntament amb el fet que les regions de les immunoglobulines són regions molt repetitives fa que sigui difícil predir en quin percentatge es troba una alteració en la població tumoral. Tot i així, a partir de la fracció al·lèlica de les alteracions oncogèniques primàries detectades

per MP-WGS vam poder estimar que les alteracions es trobaven entre un 41% i un 44%, cosa que significa que el 82-88% de les cèl·lules tumorals presenten el reordenament, i donat que aquestes mostres sempre presenten una proporció de mostra normal acompañant, podem estimar que gairebé totes les cèl·lules de la població tumoral presenten l'inserció de l'*enhancer* de les immunoglobulines al costat de *CCND3*. Dels dos casos MP-WGS (ID3 i ID6) també es va poder observar per FISH, amb mostres en bloc de parafina fixades amb formalina (FFPE), que el nombre de cèl·lules tumorals amb l'inserció era aproximadament 40% en ID3 i 60% en ID6. Aquest valors són més baixos que els estimats per MP-WGS donat que la tècnica de FISH es troba limitada per la bona hibridació de les sondes. En alguns casos, alguns nuclis no es dóna un bon marcatge i no es poden observar dues marques de cada sonda. Per tant, aquestes sondes encara que podrien ser cèl·lules positives per la translocació es compten com a negatives. En els altres casos amb reordenaments de *CCND2* o *CCND3* analitzats per FISH vam poder observar que les cèl·lules que contenen el reordenament variauen entre el 30 i el 80%, valors comparables amb els percentatge que s'observen en casos MCL Ciclina D1-positius analitzats per FISH. Per tant podem estar segurs que els reordenaments críptics de l'*enhancer* de les immunoglobulines al costat de *CCND2* i *CCND3* es troben majoritàriament en totes les cèl·lules tumorals i que aquest reordenament es pot considerar un reordenament oncogènic primari. Per observar si aquest reordenament dóna lloc a la limfomagenesi, l'inserció de l'*enhancer* de les immunoglobulines prop de *CCND2* o *CCND3* en una línia cel·lular seria necessària, tot i així creiem que, com ja es va veure en publicacions anteriors, la sobreexpressió de la ciclina D1 per si sola no provoca cap efecte tumorigènic sinó que requereix d'altres oncogens conjuntament (Lovec *et al.*, 1994), en ciclina D2 i ciclina D3 ens trobaríem en una situació similar.

Tot i que els reordenaments de les ciclines D amb la IGH ja s'han estudiat en altres neoplàsies, les insercions que presentem en l'estudi 2, de les cades lleugeres IGK i IGL tant amb *CCND2* com amb *CCND3*, són alteracions que fins al moment no s'havien detectat en neoplàsies limfoides de cèl·lula B. Els punts de trencament en les insercions també són interessants. Mentre que els punts en la regió de l'*enhancer IGK/L* es donen en regions més concretes possiblement degut a la recombinació de les regions variables de les immunoglobulines, els punts de trencament en la *CCND3* es troben en regions més allunyades (*upstream* o *downstream* del gen), regions que per atzar s'ha donat un trencament i l'inserció ha provocat una sobreexpressió del gen i un avantatge pel clon cel·lular. Les tècniques de seqüenciació, amb resolució de parells de base, ens van permetre observar que sempre hi havia una superposició d'entre 1 i 3 nucleòtids en el punt de trencament i l'inserció de l'*enhancer* proper a les ciclines. Aquesta superposició podria

ser deguda al mecanisme clàssic d'unió d'extrems no-homòlegs (NHEJ) que uneix extrems sense homologia o entre 1 i 4 nucleòtids d'homologia.

La sobreexpressió de la *CCND2* o la *CCND3* provocada pel reordenament d'un *enhancer* també s'ha detectat en diferents tumors sòlids. Oncogens com *MYC* i *MYCN* en neuroblastoma pediàtric (Zimmerman *et al.*, 2018); *TERT* en neuroblastoma (Valentijn *et al.*, 2015); *GFI1*, *PRDM6*, *GFI1B* i *DDX31* en meduloblastoma (Northcott *et al.*, 2014, 2017; Gröbner *et al.*, 2018); *IGF2* i *IRS4* en càncer colorectal (Weischenfeldt *et al.*, 2017); i *MYC* en mieloma múltiple (Affer *et al.*, 2014) es troben sobreexpressats mitjançant translocacions, deleccions, inversions, duplicacions o insercions que reordenen diferents *enhancers* propers a aquests gens. En el mieloma múltiple, per exemple, es va observar que, en les transloacions de *MYC*, els *enhancers* provenien de diferents gens com *IGH*, *IGK*, *IGL*, *NSMCE2*, *TXND5*, *FAM46C*, *FOXO3* o *PRDM1* (Affer *et al.*, 2014). En els casos de MCL Ciclina D1-negatius l'*enhancer* que s'inserta prové dels gens de les immunoglobulines, *enhancers* que són molt més potents en limfòcits B que els dels gens diferents a les immunoglobulines. Actualment hi ha molts casos amb neoplàsies limfoides de cèl·lula B que sobreexpressen oncogens com *MYC*, *BCL2* o *CCND1* però que no s'ha detectat cap alteració estructural. Una explicació per aquesta sobreexpressió seria una petita inserció d'un *enhancer* de les immunoglobulines que podria ser detectada mitjançant tècniques com NGS o tècniques moleculars com FISH amb sondes específiques. Aquestes tècniques permetrien detectar petites insercions que tècniques com el FISH amb sondes convencionals o el cariotip no les detectarien.

En els estudis anteriors de Fu i col·laboradors i Salaverria i col·laboradors, l'any 2005 i 2013, els casos MCL Ciclina D1-negatius presentaven expressió de *CCND2* o *CCND3*, però els nivells d'expressió de les Ciclines E no es va estudiar. La presència d'una expressió moderada de *CCNE1* i *CCNE2* concomitant en 7% dels casos MCL Ciclina D1-negatius va fer pensar que les ciclines E també podien ser un esdeveniment oncogènic primari alternatiu diferent a les ciclines D. Malauradament, realitzant FISH i WGS dels casos que sobreexpressaven *CCNE1* i *CCNE2* no es va observar cap reordenament que col·localitzessin *CCNE1* i *CCNE2* amb algun *enhancer* de les immunoglobulines. Així doncs, el mecanisme pel qual es sobreexpresen les dues ciclines E, les quals es troben diferents cromosomes, no queda clar. Tot i així, un dels casos presenta amplificació en el cromosoma 8 per WGS i arrays de còpia gènica, verificada per FISH, on es troba el gen *CCNE2*, però la sobreexpressió de *CCNE1* no s'explica per alteracions cromosòmiques. Una explicació podria ser l'alteració d'un regulador d'expressió *upstream* comú per les dues ciclines E degudes a la complexitat genòmica que presenten aquests casos o per la desregulació de

complexes proteics que degraden les ciclines E. De fet, la sobreexpressió de les ciclines E en neoplàsies limfoides és molt rara. En diferents publicacions de tumors sòlids ja s'havia publicat que casos amb amplificació del locus *CCNE1* i que provocava una desregulació del gen, presentaven una complexitat més elevada que els casos amb una expressió de *CCNE* menor (Spruck, Won and Reed, 1999; Hubalek *et al.*, 2004; Scaltriti *et al.*, 2011; Alsina *et al.*, 2015). Concretament, en càncer de pulmó es va observar que els casos amb sobreexpressió de *CCNE1* també conferien resistència al tractament trastuzumab (Scaltriti *et al.*, 2011). En neoplàsies limfoides de cèl·lula B només s'ha reportat un cas DLBCL que presentava una translocació de la *IGH/CCNE1* sobreexpressant el gen *CCNE1* (Nagel *et al.*, 2009). En els nostres casos, el fet que no hi hagi cap Ciclina D sobreexpressada però sí Ciclina E podria posar en dubte la seva classificació com a MCL. No obstant això, tots 4 casos presenten expressió de *SOX11* i *CD5*, morfologia blastoide i típica de MCL, una elevada complexitat genòmica, i delecions dels gens *RB1* i *CDKN2A*, conferint a aquests casos una elevada agressivitat i assemblant-se més a casos de MCL que no pas a altres neoplàsies limfoides de cèl·lula B. S'han publicat alguns casos de DLBCL i limfoma esplènic de zona marginal (SMZL) que presenten expressió de *SOX11*. En els casos de DLBCL i SMZL que vam estudiar nosaltres, tot i que l'expressió de DLBCL és més alta que els SMZL, l'expressió concomitant de *CCNE1* i *CCNE2* és molt baixa comparat amb els casos MCL Ciclina D1-negatius que expressen les dues ciclines. En resum, la sobreexpressió de les ciclines E1 i E2 concomitant representa un bon biomarcador per identificar aquest grup de MCL Ciclina D1-negatiu tant especial.

En la comparació del perfil d'alteracions genòmiques mitjançant microarrays de còpia gènica entre els MCL Ciclina D1-negatius i els MCL Ciclina D1-positius tampoc es va observar cap alteració diferencial entre els dos subgrups. Tots els casos es trobaven alterats i presentaven el mateix perfil característic (guanys de 3q, 8q i 7p, i pèrdues d'1p, 6q, 9p i 17p). El perfil d'expressió dels nostres casos MCL Ciclina D1-negatius és idèntic al perfil d'expressió dels casos MCL Ciclina D1-positius. En un ànalisi de cluster no supervisat del perfil d'expressió dels casos es van observar dos grups, en els quals es trobaven barrejats casos MCL Ciclina D1-positius amb casos MCL Ciclina D1-negatius. La diferència entre aquest dos clústers no es donava per diferències en la proliferació ni tampoc cap via d'interès tumorigènic, tret de vies relacionades amb la maduració de l'ARN o canals d'activitat. Per tant, pel que fa a les vies, els MCL Ciclina D1-positius com el MCL Ciclina D1-negatius no es poden diferenciar, suggerint que formen part de la mateixa entitat. Analitzant els gens diferencialment expressats en els dos subgrups de MCL en un ànalisis supervisat, vam observar, després d'aplicar correccions múltiples, que l'únic gen diferencialment expressat era *CCND1*. La comparació de casos es va haver de realitzar juntant tots els

casos Ciclina D1-negatius (Ciclina D2-positius, Ciclina D3-positius i Ciclina E-positius) donat que no hi havia suficient nombre de casos per poder separar aquests casos en subgrups diferents. Tant en l'estudi de Fu com en el nostre, la comparació de perfil d'expressió entre els casos MCL Ciclina D1-negatius i Ciclina D1-positius s'ha realitzat amb un tamany petit de mostres. Aquest fet i juntament amb el fet que s'han combinat en un sol grup casos MCL Ciclina D1-negatius que expressen diferents ciclines podria provocar que no s'observessin altres diferències a part de Ciclina D1.

La comparació entre els nostres casos també ens va permetre observar, encara que sense significància, que els casos que tenien més supervivència eren els casos MCL Ciclina D1-negatius D3-positius. Aquest fet podria ser degut a que aquests casos no presenten alteracions als gens d'alt risc com són *TP53* o *CDKN2A*. Els casos MCL Ciclina D1-negatius E1/E2 positius, en canvi, són els que presenten una pitjor supervivència i una alta proliferació. Aquest fet podria ser degut a l'alta complexitat genòmica que presenten, juntament amb les alteracions d'*RB1* i *CDKN2A*. *CCNE1* i *CCNE2* són dos oncogens molt més potents que qualsevol de les ciclines D. Així doncs, segons el perfil expressió, les alteracions genètiques, l'expressió de *CD5* i *SOX11*, la morfologia blastoïde i l'agressivitat que presenten aquests casos, creiem que els casos MCL Ciclina D1-negatius E-positius són un subgrup de MCL Ciclina D1-negatius. Per tant, tant la desregulació de *CCND2* com *CCND3* i possiblement *CCNE1* i *CCNE2* són mecanismes alternatius a la desregulació de *CCND1* que provoca el desenvolupament de MCL.

Creiem que aquestes noves troballes de l'**estudi 2** permetran ajudar en el diagnòstic diferencial dels MCL. D'una banda la identificació dels reordenaments dels gens de les immunoglobulines o el seu *enhancer* juntament amb les ciclines D2 i D3 en gairebé tots el MCL Ciclina D1-negatius i combinat amb l'expressió de *SOX11*, permetrà identificar molt millor aquests casos com a MCL Ciclina D1-negatius. D'altra banda, els reordenaments de *CCND2* i *CCND3* també ens permetran classificar acuradament aquells casos amb una morfologia pleomòrfica o blastoïde i que sobreexpressen *SOX11*, que podrien semblar casos amb DLBCL, però que gràcies a la identificació dels reordenaments que afecten ciclina D2 i D3, ens permetran classificar-los com a MCL Ciclina D1-negatius. A més, l'anàlisi dels nivells mRNA de les *CCND2*, *D3* i *CCNE1/E2* analitzats per qPCR també podria ser una alternativa a la detecció de les translocacions oncogèniques primàries per a la detecció d'aquests tumors, donat que el resultat que s'obté per qPCR i els obtinguts per tècniques de NGS o FISH són igualment informatius (**Figura 33**).

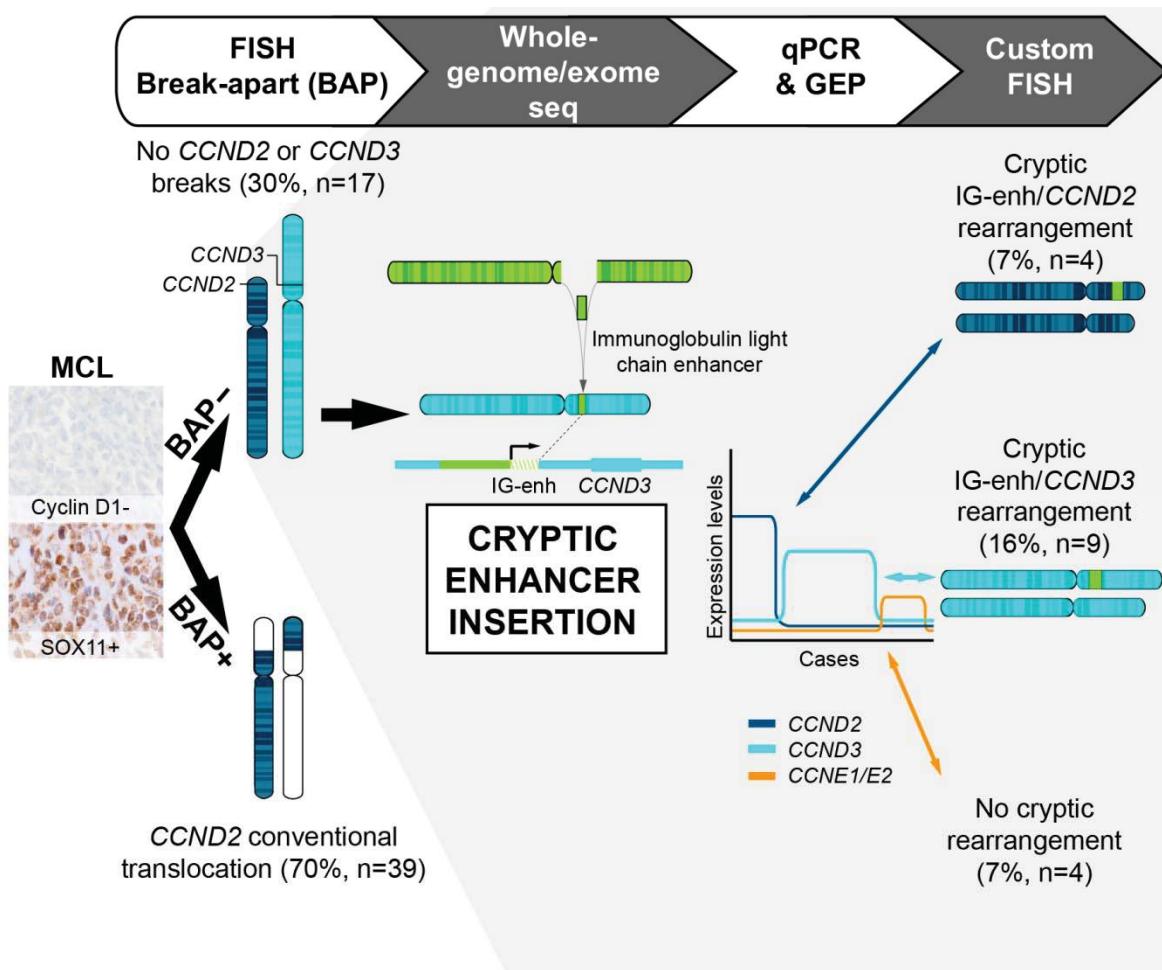


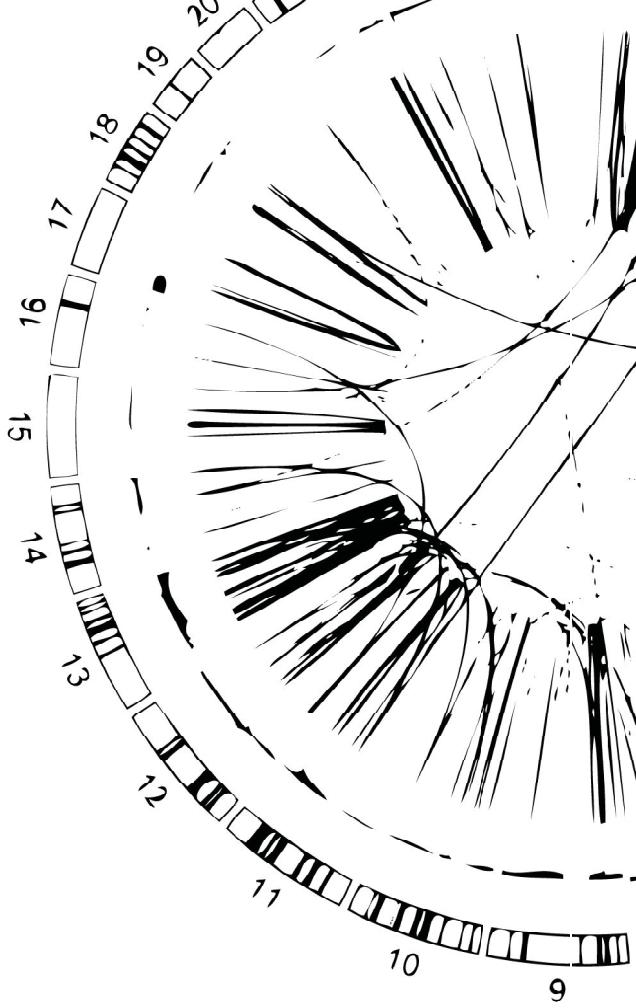
Figura 33. Resum il·lustratiu de les alteracions genètiques primàries dels MCL Ciclina D1-negatius.

Els dos estudis que s'han realitzat durant aquesta tesi doctoral, han permès observar que la tècnica de FISH té diferents limitacions en l'ús com a tècnica d'estratificació pronòstica i diagnòstica de la CLL i el MCL. En CLL l'ús de FISH per l'estratificació pronòstica de la malaltia només s'analitzava per rutina les 4 alteracions de còpia genètica principals, no obstant, degut a la necessitat de la tècnica de FISH de saber *a priori* quines regions es volen detectar, no es poden detectar reordenaments estructurals com complexitat genòmica o cromotripsi, dos reordenaments genòmics que tenen efecte pronòstic en les CLL. Les tècniques de microarray ha permès en CLL utilitzar moltes més alteracions que les 4 més recurrents i detectar cromotripsi i complexitat genòmica en un sol experiment. qChipHemo en aquest cas podria ser una bona opció per ser utilitzada com a tècnica de pronòstic en la rutina clínica. Pel que fa al MCL, la tècnica de FISH s'utilitza en la rutina clínica per al diagnòstic diferencial de la malaltia. No obstant, es requereix d'un coneixement *a priori* de les regions que es volen analitzar per utilitzar les sondes adients. Amb les sondes convencionals que s'utilitzen en la rutina clínica no es poden observar les insercions

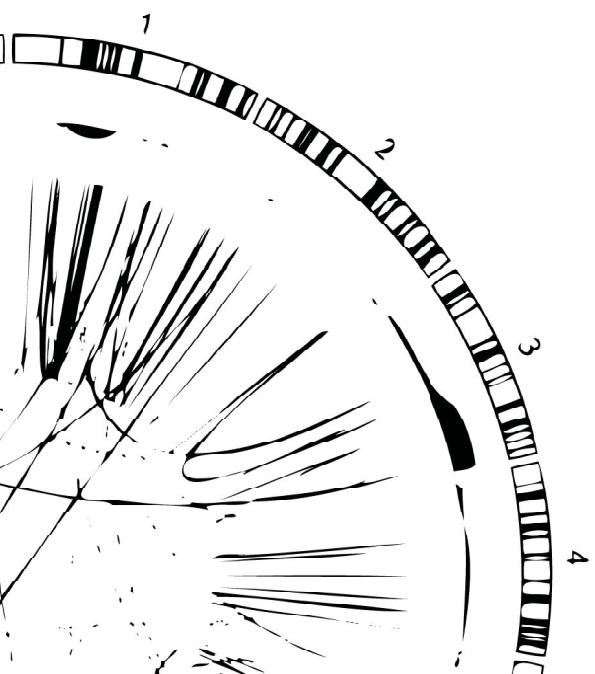
críptiques de l'*enhancer* de les immunoglobulines proper a les ciclines D2 i D3 donat que les sondes no es troben ben localitzades. Gràcies a les tècniques de NGS s'han pogut observar aquests reordenaments i s'han pogut dissenyar les sondes addcents per aquestes insercions. Per tant, creiem que en el diagnòstic diferencial de MCL l'ús de la tècnica de FISH s'ha de combinar amb altres tècniques moleculars o de NGS per averiguar els subgrups més probables del MCL i poder utilitzar d'aquesta manera les sondes de FISH més addcents per cada cas. L'ús de noves tecnologies moleculars, doncs, permeten detectar amb molta més resolució i especificitat alteracions que per limitacions del FISH o per la necessitat de fer massa experiments per cobrir el que es pot fer en un sol experiment no es poden detectar.

L'ús de microarrays i tècniques de NGS també han permès tant en l'**estudi 1** com en l'**estudi 2** detectar reordenaments que fins al moment no es podien detectar mitjançant les tècniques de FISH. En el cas de la CLL, la cromotripsi només podria ser detectada per FISH si es realitzessin molts experiments diferents i si s'utilitzessin sondes en els punts de trencatment, i també podria ser detectada per cariotip, tot i que aquesta tècnica requereix les cèl·lules de CLL en cultiu, les quals tenen una baixa taxa de creixement. Amb el microarray no es requereix de cèl·lules en cultiu i només s'ha de realitzar un sol experiment per poder detectar cromotripsi. Pel que fa a MCL, les insercions críptiques mai s'haguessin vist per FISH utilitzant les sondes convencional donat que les sondes utilitzades només podien detectar translocacions recíproques i les insercions críptiques de l'*enhancer* quedaven indetectades. Les tècniques de NGS han permès detectar aquestes petites insercions i ens ha permès dissenyar unes sondes específiques per a la identificació de la inserció de l'*enhancer* mitjançant FISH. L'ús de noves tècniques moleculars també ens ha permès classificar els casos en subgrups diferents. En CLL, classificant els casos en subgrups més agressius amb una menor supervivència segons si presenten 17p, 11q, cromotripsi o complexitat genòmica. En MCL Ciclina D1-negatius, gràcies al perfil d'expressió gènica, qPCR, WGS i microarrays de còpia gènica, en ha permès subclassificar els casos en MCL Ciclina D1-negatiu D2-postius, D3-positius i fins i tot el que sembla un petit subgrup ciclina E positius més agressius amb una supervivència menor i una proliferació major.

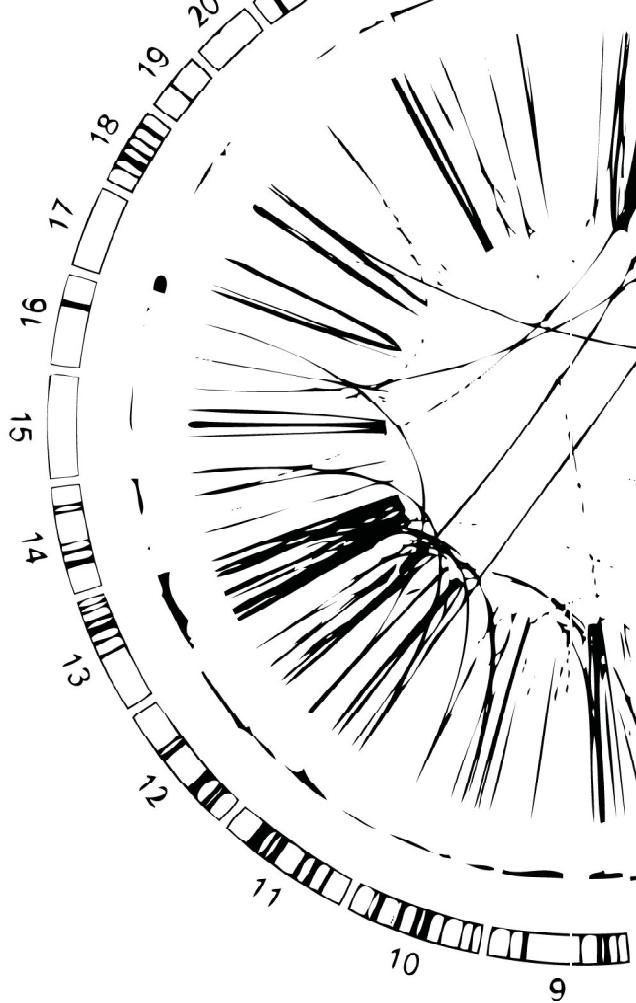
Per concloure, els estudis daquesta tesi han permès destacar la necessitat d'utilitzar noves tècniques moleculars per tal de descobrir i analitzar nous reordenaments estructurals que expliquin tant les alteracions primàries i secundàries de les CLL i MCL, com subclassificar les mostres en diferents subgrups els quals poden tenir diferent significat pronòstic i diagnòstic.



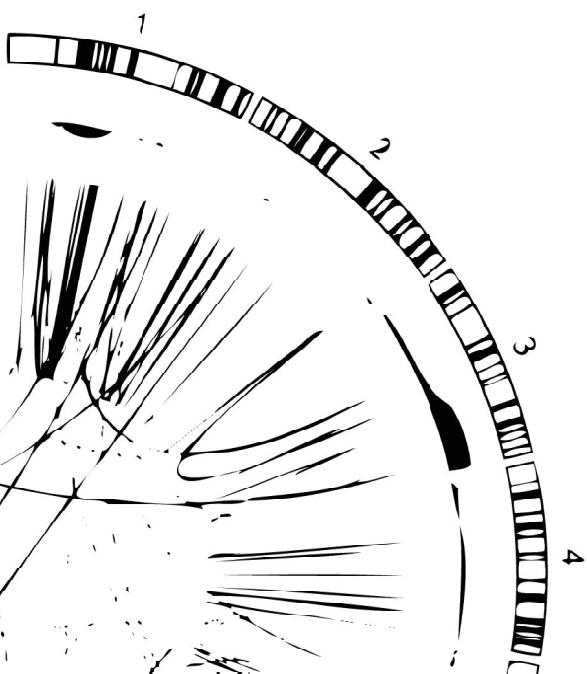
CONCLUSIONS



1. El microarray que hem dissenyat, qChipHemo, permet detectar en un sol experiment, les 4 alteracions principals en CLL (deleccions 11q, 13q, 17p i trisomia 12), altres regions alterades, detectar complexitat genòmica i cromotripsi. La detecció d'aquestes alteracions millora l'estratificació pronòstica que s'obté utilitzant només la tècnica FISH amb 4 marcadors.
2. Les 4 alteracions que es poden detectar tant per FISH, SNP 6.0 i qChipHemo en CLL presenten resultats similars. La resolució i especificitat de qChipHemo també és molt similar a la tècnica de FISH, però l'anàlisi dels microarrays és més objectiu i automatitzat.
3. qChipHemo permet detectar alteracions en casos de CLL que per tècnica de FISH presenten un resultat normal en els 4 marcadors.
4. Presentar 6 o més CNA, o cromotripsi, mitjançant qChipHemo, s'associa a una menor supervivència en CLL.
5. Utilitzant FISH *break-apart* hem detectat que 70% dels casos MCL Ciclina D1-negatiu presenten la translocació de CCND2, un 15% més de casos que l'estudi anterior.
6. En MCL Ciclina D1-negatiu i utilitzant tècniques de NGS, hem detectat una inserció críptica de l'*enhancer* de les IGK i IGL al costat de CCND3 que provoca la seva sobreexpressió, de manera similar com ho fan les translocacions de les immunoglobulines amb CCND1 i CCND2.
7. Gràcies a les troballes detectades per NGS s'han pogut dissengar sondes específiques per la inserció críptica de l'*enhancer* de les immunoglobulines i s'ha pogut detectar que 16% dels casos MCL Ciclina D1-negatius presenten la inserció de l'*enhancer* proper a CCND3 i 7% dels casos que presenten la inserció propera a CCND2.
8. La inserció de l'*enhancer* de les immunoglobulines propera a CCND2 o CCND3 és un mecanisme oncogènic primari alternatiu a les translocacions de CCND1 i CCND2 en MCL.
9. El 7% dels casos MCL Ciclina D1-negatiu sense reordenaments de CCND2 i CCND3 sobreexpressen ciclina E1 i E2 concomitant, tot i que no s'ha observat cap reordenament que expliqui la sobreexpressió. La detecció de ciclina E1 i E2 són bons biomarcadors per aquest subgrup de MCL i pot ajudar al seu diagnòstic diferencial.
10. L'anàlisi dels nivells d'mRNA de la ciclina D2, ciclina D3 i ciclina E1/E2 concomitant analitzats per qPCR representa una alternativa a la detecció dels reordenaments oncogènics.
11. Hem desenvolupat noves eines moleculars útils per al diagnòstic i l'estratificació pronòstica en CLL i MCL.



BIBLIOGRAFIA



- Affer, M. *et al.* (2014) 'Promiscuous MYC locus rearrangements hijack enhancers but mostly super-enhancers to dysregulate MYC expression in multiple myeloma', *Leukemia*, 28(8), pp. 1725–1735. doi: 10.1038/leu.2014.70.
- Alizadeh, A. A. *et al.* (2000) 'Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling', *Nature*. Nature Publishing Group, 403(6769), pp. 503–511. doi: 10.1038/35000501.
- Alsina, M. *et al.* (2015) 'Cyclin E amplification/overexpression is associated with poor prognosis in gastric cancer', *Annals of Oncology*, 26(2), pp. 438–439. doi: 10.1093/annonc/mdu535.
- Austen, B. *et al.* (2007) 'Mutation status of the residual ATM allele is an important determinant of the cellular response to chemotherapy and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia containing an 11q deletion.', *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 25(34), pp. 5448–57. doi: 10.1200/JCO.2007.11.2649.
- Baca, S. C. *et al.* (2013) 'Punctuated Evolution of Prostate Cancer Genomes', *Cell*, 153(3), pp. 666–677. doi: 10.1016/j.cell.2013.03.021.
- Balatti, V. *et al.* (2012) 'NOTCH1 mutations in CLL associated with trisomy 12', *Blood*, 119(2), pp. 329–331. doi: 10.1182/blood-2011-10-386144.
- Baliakas, P. *et al.* (2014) 'Chromosomal translocations and karyotype complexity in chronic lymphocytic leukemia: A systematic reappraisal of classic cytogenetic data', *American Journal of Hematology*, 89(3), pp. 249–255. doi: 10.1002/ajh.23618.
- Baliakas, P. *et al.* (2015) 'Recurrent mutations refine prognosis in chronic lymphocytic leukemia', *Leukemia*, 29(2), pp. 329–336. doi: 10.1038/leu.2014.196.
- Bassaganyas, L. *et al.* (2013) 'Sporadic and reversible chromothripsis in chronic lymphocytic leukemia revealed by longitudinal genomic analysis', *Leukemia*, 27(12), pp. 2376–2379. doi: 10.1038/leu.2013.127.
- Beà, S. *et al.* (2009) 'Uniparental disomies, homozygous deletions, amplifications, and target genes in mantle cell lymphoma revealed by integrative high-resolution whole-genome profiling.', *Blood*. American Society of Hematology, 113(13), pp. 3059–69. doi: 10.1182/blood-2008-07-170183.
- Beà, S. *et al.* (2013) 'Landscape of somatic mutations and clonal evolution in mantle cell lymphoma.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(45), pp. 18250–5. doi: 10.1073/pnas.1314608110.
- Beekman, R. *et al.* (2018) 'The reference epigenome and regulatory chromatin landscape of chronic lymphocytic leukemia', *Nature Medicine*, 24(6), pp. 868–880. doi: 10.1038/s41591-018-0028-4.

- Bignell, G. R. *et al.* (2007) 'Architectures of somatic genomic rearrangement in human cancer amplicons at sequence-level resolution', *Genome Research*, 17(9), pp. 1296–1303. doi: 10.1101/gr.6522707.
- Bortnick, A. and Allman, D. (2013) 'What Is and What Should Always Have Been: Long-lived Plasma cells Induced by T-cell Independent Antigens1'. doi: 10.4049/jimmunol.1300161.
- Bosch, F. *et al.* (2002) 'Fludarabine, cyclophosphamide and mitoxantrone in the treatment of resistant or relapsed chronic lymphocytic leukaemia.', *British journal of haematology*, 119(4), pp. 976–84. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12472576> (Accessed: 7 November 2018).
- Britt-Compton, B. *et al.* (2012) 'Extreme telomere erosion in ATM-mutated and 11q-deleted CLL patients is independent of disease stage', *Leukemia*, 26(4), pp. 826–830. doi: 10.1038/leu.2011.281.
- Bunting, S. F. and Nussenzweig, A. (2013) 'End-joining, translocations and cancer', *Nature Reviews Cancer*, 13(7), pp. 443–454. doi: 10.1038/nrc3537.
- Byrd, J. C. *et al.* (2013) 'Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia.', *The New England journal of medicine*. NIH Public Access, 369(1), pp. 32–42. doi: 10.1056/NEJMoa1215637.
- Calin, G. A. *et al.* (2005) 'A MicroRNA Signature Associated with Prognosis and Progression in Chronic Lymphocytic Leukemia', *New England Journal of Medicine*, 353(17), pp. 1793–1801. doi: 10.1056/NEJMoa050995.
- Camacho, E. *et al.* (2002) 'ATM gene inactivation in mantle cell lymphoma mainly occurs by truncating mutations and missense mutations involving the phosphatidylinositol-3 kinase domain and is associated with increasing numbers of chromosomal imbalances.', *Blood*, 99(1), pp. 238–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11756177> (Accessed: 27 August 2018).
- Campbell, P. J. *et al.* (2010) 'The patterns and dynamics of genomic instability in metastatic pancreatic cancer', *Nature*, 467(7319), pp. 1109–1113. doi: 10.1038/nature09460.
- Campbell, P. J. and Martincorena, I. (2015) 'Somatic mutation in cancer and normal cells', *Science*, 349(6255), pp. 1483–1489. doi: 10.1126/science.aab4082.
- Campo, E. *et al.* (2011) 'The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications.', *Blood*. American Society of Hematology, 117(19), pp. 5019–32. doi: 10.1182/blood-2011-01-293050.
- Campo, E. (2013) 'Whole genome profiling and other high throughput technologies in lymphoid neoplasms—current contributions and future hopes', *Modern Pathology*, 26(S1), pp. S97–S110. doi: 10.1038/modpathol.2012.179.
- Campo, E. and Rule, S. (2015) 'Mantle cell lymphoma: evolving management strategies.', *Blood*, 125(1), pp. 48–55. doi: 10.1182/blood-2014-05-521898.

- Casimiro, M. C. *et al.* (2012) 'ChIP sequencing of cyclin D1 reveals a transcriptional role in chromosomal instability in mice.', *The Journal of clinical investigation*, 122(3), pp. 833–43. doi: 10.1172/JCI60256.
- Ceccaldi, R., Rondinelli, B. and D'Andrea, A. D. (2016) 'Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break.', *Trends in cell biology*. NIH Public Access, 26(1), pp. 52–64. doi: 10.1016/j.tcb.2015.07.009.
- Chapiro, E. *et al.* (2010) 'Gain of the short arm of chromosome 2 (2p) is a frequent recurring chromosome aberration in untreated chronic lymphocytic leukemia (CLL) at advanced stages', *Leukemia Research*, 34(1), pp. 63–68. doi: 10.1016/j.leukres.2009.03.042.
- Clot, G. *et al.* (2018) 'A gene signature that distinguishes conventional and leukemic nonnodal mantle cell lymphoma helps predict outcome.', *Blood*. American Society of Hematology, 132(4), pp. 413–422. doi: 10.1182/blood-2018-03-838136.
- Cosson, A. *et al.* (2014) '14q deletions are associated with trisomy 12, NOTCH1 mutations and unmutated *IGHV* genes in chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic lymphoma', *Genes, Chromosomes and Cancer*, 53(8), pp. 657–666. doi: 10.1002/gcc.22176.
- Crasta, K. *et al.* (2012) 'DNA breaks and chromosome pulverization from errors in mitosis', *Nature*, 482(7383), pp. 53–58. doi: 10.1038/nature10802.
- Damle, R. N. *et al.* (1999) 'Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia.', *Blood*, 94(6), pp. 1840–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10477712> (Accessed: 10 July 2018).
- Damle, R. N. *et al.* (2004) 'Telomere length and telomerase activity delineate distinctive replicative features of the B-CLL subgroups defined by immunoglobulin V gene mutations', *Blood*, 103(2), pp. 375–382. doi: 10.1182/blood-2003-04-1345.
- Delgado, J. *et al.* (2014) 'Genomic complexity and *IGHV* mutational status are key predictors of outcome of chronic lymphocytic leukemia patients with TP53 disruption.', *Haematologica*. Ferrata Storti Foundation, 99(11), pp. e231-4. doi: 10.3324/haematol.2014.108365.
- Dicker, F. *et al.* (2009) 'The detection of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia independently predicts rapid disease progression and is highly correlated with a complex aberrant karyotype', *Leukemia*, 23(1), pp. 117–124. doi: 10.1038/leu.2008.274.
- Döhner, H. *et al.* (1997) '11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis.', *Blood*, 89(7), pp. 2516–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9116297> (Accessed: 27 August 2018).
- Döhner, H. *et al.* (2000) 'Genomic Aberrations and Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia', *New England Journal of Medicine*, 343(26), pp. 1910–1916. doi:

- 10.1056/NEJM200012283432602.
- Dreyling, M. et al. (2017) 'Newly diagnosed and relapsed mantle cell lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†', *Annals of Oncology*. Oxford University Press, 28(suppl_4), pp. iv62-iv71. doi: 10.1093/annonc/mdx223.
- Edelmann, J. et al. (2012) 'High-resolution genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia reveals new recurrent genomic alterations.', *Blood*. American Society of Hematology, 120(24), pp. 4783–94. doi: 10.1182/blood-2012-04-423517.
- Ek, S. et al. (2008) 'Nuclear expression of the non B-cell lineage Sox11 transcription factor identifies mantle cell lymphoma.', *Blood*. American Society of Hematology, 111(2), pp. 800–5. doi: 10.1182/blood-2007-06-093401.
- Fabbri, G. et al. (2017) 'Common nonmutational NOTCH1 activation in chronic lymphocytic leukemia', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(14), pp. E2911–E2919. doi: 10.1073/pnas.1702564114.
- Fernandez, V. et al. (2010) 'Genomic and Gene Expression Profiling Defines Indolent Forms of Mantle Cell Lymphoma', *Cancer Research*, 70(4), pp. 1408–1418. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3419.
- Ferrer, A. et al. (2008) 'Central nervous system involvement in mantle cell lymphoma', *Annals of Oncology*, 19, pp. 135–141. doi: 10.1093/annonc/mdm447.
- Feuk, L., Carson, A. R. and Scherer, S. W. (2006) 'Structural variation in the human genome', *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group, 7(2), pp. 85–97. doi: 10.1038/nrg1767.
- Fitchett, M. et al. (1987) 'Chromosome abnormalities involving band 13q14 in hematologic malignancies.', *Cancer genetics and cytogenetics*, 24(1), pp. 143–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3491671> (Accessed: 10 July 2018).
- Fu, K. et al. (2005) 'Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study based on gene expression profiling.', *Blood*, 106(13), pp. 4315–21. doi: 10.1182/blood-2005-04-1753.
- Fu, M. et al. (2004) 'Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions.', *Endocrinology*, 145(12), pp. 5439–47. doi: 10.1210/en.2004-0959.
- Gahrton, G. et al. (1980) 'Extra chromosome 12 in chronic lymphocytic leukaemia.', *Lancet (London, England)*, 1(8160), pp. 146–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6101473> (Accessed: 10 July 2018).
- Gao, G., Smith, D. I. and Gilbert, M. T. (2015) 'Mate-Pair Sequencing as a Powerful Clinical Tool for the Characterization of Cancers with a DNA Viral Etiology', *Viruses*, 7, pp. 4507–4528. doi: 10.3390/v7082831.
- Garding, A. et al. (2013) 'Epigenetic Upregulation of lncRNAs at 13q14.3 in Leukemia Is

- Linked to the In Cis Downregulation of a Gene Cluster That Targets NF- κ B', *PLoS Genetics*. Edited by H. L. Grimes, 9(4), p. e1003373. doi: 10.1371/journal.pgen.1003373.
- Gesk, S. et al. (2006) 'A chromosomal translocation in cyclin D1-negative/cyclin D2-positive mantle cell lymphoma fuses the CCND2 gene to the IGK locus.', *Blood*. American Society of Hematology, 108(3), pp. 1109–10. doi: 10.1182/blood-2006-01-0015.
- Del Giudice, I. et al. (2012) 'Behind the scenes of non-nodal MCL: downmodulation of genes involved in actin cytoskeleton organization, cell projection, cell adhesion, tumour invasion, TP53 pathway and mutated status of immunoglobulin heavy chain genes', *British Journal of Haematology*, 156(5), pp. 601–611. doi: 10.1111/j.1365-2141.2011.08962.x.
- Greaves, M. and Maley, C. C. (2012) 'Clonal evolution in cancer', *Nature*, 481(7381), pp. 306–313. doi: 10.1038/nature10762.
- Gröbner, S. N. et al. (2018) 'The landscape of genomic alterations across childhood cancers', *Nature*, 555(7696), pp. 321–327. doi: 10.1038/nature25480.
- Gunnarsson, R. et al. (2010) 'Large but not small copy-number alterations correlate to high-risk genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia: a high-resolution genomic screening of newly diagnosed patients', *Leukemia*, 24(1), pp. 211–215. doi: 10.1038/leu.2009.187.
- Hallek, M. et al. (2010) 'Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial', *The Lancet*, 376(9747), pp. 1164–1174. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61381-5.
- Haluska, F. G. et al. (1986) 'The t(8; 14) chromosomal translocation occurring in B-cell malignancies results from mistakes in V–D–J joining', *Nature*. Nature Publishing Group, 324(6093), pp. 158–161. doi: 10.1038/324158a0.
- Hamblin, T. J. et al. (1999) 'Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia.', *Blood*, 94(6), pp. 1848–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10477713> (Accessed: 10 July 2018).
- Harbour, J. W. et al. (1999) 'Cdk Phosphorylation Triggers Sequential Intramolecular Interactions that Progressively Block Rb Functions as Cells Move through G1', *Cell*. Cell Press, 98(6), pp. 859–869. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81519-6.
- Hartmann, E. M. et al. (2010) 'Pathway discovery in mantle cell lymphoma by integrated analysis of high-resolution gene expression and copy number profiling.', *Blood*. American Society of Hematology, 116(6), pp. 953–61. doi: 10.1182/blood-2010-01-263806.
- Houldsworth, J. et al. (2014) 'Genomic imbalance defines three prognostic groups for risk stratification of patients with chronic lymphocytic leukemia', *Leukemia & Lymphoma*,

- 55(4), pp. 920–928. doi: 10.3109/10428194.2013.845882.
- Hu, Z. et al. (2017) ‘Mantle Cell Lymphoma With MYC Rearrangement: A Report of 17 Patients.’, *The American journal of surgical pathology*, 41(2), pp. 216–224. doi: 10.1097/PAS.0000000000000758.
- Hubalek, M. M. et al. (2004) ‘Cyclin E dysregulation and chromosomal instability in endometrial cancer.’, *Oncogene*, 23(23), pp. 4187–92. doi: 10.1038/sj.onc.1207560.
- Huh, Y. O. et al. (2008) ‘MYC translocation in chronic lymphocytic leukaemia is associated with increased prolymphocytes and a poor prognosis’, *British Journal of Haematology*, 142(1), pp. 36–44. doi: 10.1111/j.1365-2141.2008.07152.x.
- Huh, Y. O. et al. (2011) ‘Chronic Lymphocytic Leukemia With t(14;19)(q32;q13) Is Characterized by Atypical Morphologic and Immunophenotypic Features and Distinctive Genetic Features’, *American Journal of Clinical Pathology*. Oxford University Press, 135(5), pp. 686–696. doi: 10.1309/AJCPOEFP3SLX6HXJ.
- Hurley, J. N. et al. (1980) ‘Chromosome abnormalities of leukaemic B lymphocytes in chronic lymphocytic leukaemia.’, *Nature*, 283(5742), pp. 76–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6965317> (Accessed: 10 July 2018).
- Jares, P., Colomer, D. and Campo, E. (2007) ‘Genetic and molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: perspectives for new targeted therapeutics’, *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group, 7(10), pp. 750–762. doi: 10.1038/nrc2230.
- Jares, P., Colomer, D. and Campo, E. (2012) ‘Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma.’, *The Journal of clinical investigation*. American Society for Clinical Investigation, 122(10), pp. 3416–23. doi: 10.1172/JCI61272.
- Kämpjärvi, K. et al. (2015) ‘Somatic MED12 mutations are associated with poor prognosis markers in chronic lymphocytic leukemia’, *Oncotarget*, 6(3), pp. 1884–8. doi: 10.18632/oncotarget.2753.
- Kikushige, Y. et al. (2011) ‘Self-Renewing Hematopoietic Stem Cell Is the Primary Target in Pathogenesis of Human Chronic Lymphocytic Leukemia’, *Cancer Cell*, 20(2), pp. 246–259. doi: 10.1016/j.ccr.2011.06.029.
- Klein, U. and Dalla-Favera, R. (2008) ‘Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy’, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 8(1), pp. 22–33. doi: 10.1038/nri2217.
- Kolquist, K. A. et al. (2011) ‘Evaluation of chronic lymphocytic leukemia by oligonucleotide-based microarray analysis uncovers novel aberrations not detected by FISH or cytogenetic analysis.’, *Molecular cytogenetics*. BioMed Central, 4, p. 25. doi: 10.1186/1755-8166-4-25.
- Korbel, J. O. and Campbell, P. J. (2013) ‘Criteria for Inference of Chromothripsis in Cancer Genomes’, *Cell*. Cell Press, 152(6), pp. 1226–1236. doi: 10.1016/J.CELL.2013.02.023.

- Kridel, R. et al. (2012) 'Whole transcriptome sequencing reveals recurrent NOTCH1 mutations in mantle cell lymphoma.', *Blood*, 119(9), pp. 1963–71. doi: 10.1182/blood-2011-11-391474.
- Kujawski, L. et al. (2008) 'Genomic complexity identifies patients with aggressive chronic lymphocytic leukemia.', *Blood*. American Society of Hematology, 112(5), pp. 1993–2003. doi: 10.1182/blood-2007-07-099432.
- Kulis, M. et al. (2012) 'Epigenomic analysis detects widespread gene-body DNA hypomethylation in chronic lymphocytic leukemia', *Nature Genetics*, 44(11), pp. 1236–1242. doi: 10.1038/ng.2443.
- Landau, D. A. et al. (2013) 'Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia.', *Cell*. Elsevier, 152(4), pp. 714–26. doi: 10.1016/j.cell.2013.01.019.
- Landau, D. A. et al. (2014) 'Locally Disordered Methylation Forms the Basis of Intratumor Methylome Variation in Chronic Lymphocytic Leukemia', *Cancer Cell*, 26(6), pp. 813–825. doi: 10.1016/j.ccr.2014.10.012.
- Landau, D. A. et al. (2015) 'Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse', *Nature*, 526(7574), pp. 525–530. doi: 10.1038/nature15395.
- Lawrence, M. S. et al. (2013) 'Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes', *Nature*, 499(7457), pp. 214–218. doi: 10.1038/nature12213.
- Lecluse, Y. et al. (2009) 't(11;14)-positive clones can persist over a long period of time in the peripheral blood of healthy individuals', *Leukemia*. Nature Publishing Group, 23(6), pp. 1190–1193. doi: 10.1038/leu.2009.31.
- Li, L. et al. (2013) 'A far downstream enhancer for murine Bcl11b controls its T-cell specific expression', *Blood*, 122(6), pp. 902–911. doi: 10.1182/blood-2012-08-447839.
- Lia, M. et al. (2012) 'Functional dissection of the chromosome 13q14 tumor-suppressor locus using transgenic mouse lines', *Blood*, 119(13), pp. 2981–2990. doi: 10.1182/blood-2011-09-381814.
- Lin, T. T. et al. (2010) 'Telomere dysfunction and fusion during the progression of chronic lymphocytic leukemia: evidence for a telomere crisis', *Blood*, 116(11), pp. 1899–1907. doi: 10.1182/blood-2010-02-272104.
- Ljungstrom, V. et al. (2016) 'Whole-exome sequencing in relapsing chronic lymphocytic leukemia: clinical impact of recurrent RPS15 mutations', *Blood*, 127(8), pp. 1007–1016. doi: 10.1182/blood-2015-10-674572.
- López, C. et al. (2012) 'Different distribution of NOTCH1 mutations in chronic lymphocytic leukemia with isolated trisomy 12 or associated with other chromosomal alterations', *Genes, Chromosomes and Cancer*, 51(9), pp. 881–889. doi: 10.1002/gcc.21972.
- Lovec, H. et al. (1994) 'Cyclin D1/bcl-1 cooperates with myc genes in the generation of B-cell

- lymphoma in transgenic mice.', *The EMBO journal*, 13(15), pp. 3487–95. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8062825> (Accessed: 7 November 2018).
- Mansouri, L. et al. (2015) 'Functional loss of I κ B ϵ leads to NF- κ B deregulation in aggressive chronic lymphocytic leukemia', *The Journal of Experimental Medicine*, 212(6), pp. 833–843. doi: 10.1084/jem.20142009.
- Martínez-Trillo, A. et al. (2016) 'Clinical impact of MYD88 mutations in chronic lymphocytic leukemia.', *Blood*. American Society of Hematology, 127(12), pp. 1611–3. doi: 10.1182/blood-2015-10-678490.
- Matutes, E. et al. (1996) 'Trisomy 12 defines a group of CLL with atypical morphology: correlation between cytogenetic, clinical and laboratory features in 544 patients.', *British journal of haematology*, 92(2), pp. 382–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8603004> (Accessed: 10 July 2018).
- Mautner, J. et al. (1995) 'Identification of two enhancer elements downstream of the human c-myc gene.', *Nucleic acids research*. Oxford University Press, 23(1), pp. 72–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7870592> (Accessed: 27 August 2018).
- Meyerson, M. and Pellman, D. (2011) 'Cancer Genomes Evolve by Pulverizing Single Chromosomes', *Cell*, 144(1), pp. 9–10. doi: 10.1016/j.cell.2010.12.025.
- Mohanty, A. et al. (2016) 'CCND1 mutations increase protein stability and promote ibrutinib resistance in mantle cell lymphoma.', *Oncotarget*. Impact Journals, LLC, 7(45), pp. 73558–73572. doi: 10.18632/oncotarget.12434.
- Moncunill, V. et al. (2014) 'Comprehensive characterization of complex structural variations in cancer by directly comparing genome sequence reads', *Nature Biotechnology*. Nature Publishing Group, 32(11), pp. 1106–1112. doi: 10.1038/nbt.3027.
- Monroe, J. G. and Dorshkind, K. (2007) 'Fate Decisions Regulating Bone Marrow and Peripheral B Lymphocyte Development', in *Advances in immunology*, pp. 1–50. doi: 10.1016/S0065-2776(07)95001-4.
- Morgan, G. et al. (2014) 'B-cell malignancies: capture-sequencing strategies for identification of gene rearrangements and translocations into immunoglobulin gene loci', *Blood and Lymphatic Cancer: Targets and Therapy*, p. 107. doi: 10.2147/BLCCT.S51503.
- Mozos, A. et al. (2009) 'SOX11 expression is highly specific for mantle cell lymphoma and identifies the cyclin D1-negative subtype.', *Haematologica*. Ferrata Storti Foundation, 94(11), pp. 1555–62. doi: 10.3324/haematol.2009.010264.
- Nadeu, F. et al. (2016) 'Clinical impact of clonal and subclonal TP53, SF3B1, BIRC3, NOTCH1, and ATM mutations in chronic lymphocytic leukemia', *Blood*, 127(17), pp. 2122–2130. doi: 10.1182/blood-2015-07-659144.
- Nadeu, F. et al. (2018) 'Clinical impact of the subclonal architecture and mutational complexity in chronic lymphocytic leukemia', *Leukemia*, 32(3), pp. 645–653. doi:

- 10.1038/leu.2017.291.
- Nagel, I. et al. (2009) 'Identification of the gene encoding cyclin E1 (CCNE1) as a novel IGH translocation partner in t(14;19)(q32;q12) in diffuse large B-cell lymphoma.', *Haematologica*. Ferrata Storti Foundation, 94(7), pp. 1020–3. doi: 10.3324/haematol.2008.000968.
- Nagel, I. et al. (2010) 'Deregulation of the telomerase reverse transcriptase (TERT) gene by chromosomal translocations in B-cell malignancies', *Blood*, 116(8), pp. 1317–1320. doi: 10.1182/blood-2009-09-240440.
- Nakagawa, H. et al. (2015) 'Cancer whole-genome sequencing: present and future', *Oncogene*. Nature Publishing Group, 34(49), pp. 5943–5950. doi: 10.1038/onc.2015.90.
- Navarro, A. et al. (2012) 'Molecular subsets of mantle cell lymphoma defined by the IGHV mutational status and SOX11 expression have distinct biologic and clinical features.', *Cancer research*. NIH Public Access, 72(20), pp. 5307–16. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1615.
- Northcott, P. A. et al. (2012) 'Subgroup-specific structural variation across 1,000 medulloblastoma genomes', *Nature*, 488(7409), pp. 49–56. doi: 10.1038/nature11327.
- Northcott, P. A. et al. (2014) 'Enhancer hijacking activates GFI1 family oncogenes in medulloblastoma', *Nature*. Nature Publishing Group, 511(7510), pp. 428–434. doi: 10.1038/nature13379.
- Northcott, P. A. et al. (2017) 'The whole-genome landscape of medulloblastoma subtypes', *Nature*. Nature Publishing Group, 547(7663), pp. 311–317. doi: 10.1038/nature22973.
- Oakes, C. C. et al. (2014) 'Evolution of DNA Methylation Is Linked to Genetic Aberrations in Chronic Lymphocytic Leukemia', *Cancer Discovery*, 4(3), pp. 348–361. doi: 10.1158/2159-8290.CD-13-0349.
- Oscier, D. G. et al. (2013) 'The clinical significance of NOTCH1 and SF3B1 mutations in the UK LRF CLL4 trial', *Blood*, 121(3), pp. 468–475. doi: 10.1182/blood-2012-05-429282.
- Ouillette, P. et al. (2011) 'Acquired genomic copy number aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia', *Blood*, 118(11), pp. 3051–3061. doi: 10.1182/blood-2010-12-327858.
- Ouillette, P. et al. (2013) 'Clonal Evolution, Genomic Drivers, and Effects of Therapy in Chronic Lymphocytic Leukemia', *Clinical Cancer Research*, 19(11), pp. 2893–2904. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0138.
- Palomero, J. et al. (2016) 'SOX11 defines two different subtypes of mantle cell lymphoma through transcriptional regulation of BCL6', *Leukemia*. Nature Publishing Group, 30(7), pp. 1596–1599. doi: 10.1038/leu.2015.355.
- Panero, J. et al. (2016) 'Acquired TERT promoter mutations stimulate TERT transcription in mantle cell lymphoma', *American Journal of Hematology*, 91(5), pp. 481–485. doi:

- 10.1002/ajh.24324.
- Parker, H. et al. (2016) 'Genomic disruption of the histone methyltransferase SETD2 in chronic lymphocytic leukaemia', *Leukemia*, 30(11), pp. 2179–2186. doi: 10.1038/leu.2016.134.
- Patel, A. et al. (2008) 'Validation of a targeted DNA microarray for the clinical evaluation of recurrent abnormalities in chronic lymphocytic leukemia', *American Journal of Hematology*. Wiley-Blackwell, 83(7), pp. 540–546. doi: 10.1002/ajh.21145.
- Pennacchio, L. A. et al. (2013) 'Enhancers: five essential questions', *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group, 14(4), pp. 288–295. doi: 10.1038/nrg3458.
- Pérez-Galán, P., Dreyling, M. and Wiestner, A. (2011) 'Mantle cell lymphoma: biology, pathogenesis, and the molecular basis of treatment in the genomic era.', *Blood*. American Society of Hematology, 117(1), pp. 26–38. doi: 10.1182/blood-2010-04-189977.
- Pieper, K., Grimbacher, B. and Eibel, H. (2013) 'B-cell biology and development', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131(4), pp. 959–971. doi: 10.1016/j.jaci.2013.01.046.
- Pon, J. R. et al. (2015) 'MEF2B mutations in non-Hodgkin lymphoma dysregulate cell migration by decreasing MEF2B target gene activation', *Nature Communications*, 6(1), p. 7953. doi: 10.1038/ncomms8953.
- Poncet, D. et al. (2008) 'Changes in the expression of telomere maintenance genes suggest global telomere dysfunction in B-chronic lymphocytic leukemia', *Blood*, 111(4), pp. 2388–2391. doi: 10.1182/blood-2007-09-111245.
- Puente, X. S. et al. (2011) 'Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia', *Nature*, 475(7354), pp. 101–105. doi: 10.1038/nature10113.
- Puente, X. S. et al. (2015) 'Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia.', *Nature*. Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved., advance on. doi: 10.1038/nature14666.
- Puente, X. S., Jares, P. and Campo, E. (2018) 'Chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma: crossroads of genetic and microenvironment interactions.', *Blood*. American Society of Hematology, 131(21), pp. 2283–2296. doi: 10.1182/blood-2017-10-764373.
- Puiggros, A. et al. (2014) 'Interstitial 13q14 deletions detected in the karyotype and translocations with concomitant deletion at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia: Different genetic mechanisms but equivalent poorer clinical outcome', *Genes, Chromosomes and Cancer*, 53(9), pp. 788–797. doi: 10.1002/gcc.22188.
- Queirós, A. C. et al. (2015) 'A B-cell epigenetic signature defines three biologic subgroups of chronic lymphocytic leukemia with clinical impact', *Leukemia*, 29(3), pp. 598–605. doi:

- 10.1038/leu.2014.252.
- Queirós, A. C. et al. (2016) 'Decoding the DNA Methylome of Mantle Cell Lymphoma in the Light of the Entire B Cell Lineage.', *Cancer cell*. Europe PMC Funders, 30(5), pp. 806–821. doi: 10.1016/j.ccr.2016.09.014.
- Quesada, V. et al. (2012) 'Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia', *Nature Genetics*, 44(1), pp. 47–52. doi: 10.1038/ng.1032.
- Ramsay, A. J. et al. (2013) 'POT1 mutations cause telomere dysfunction in chronic lymphocytic leukemia', *Nature Genetics*, 45(5), pp. 526–530. doi: 10.1038/ng.2584.
- Rausch, T. et al. (2012) 'Genome Sequencing of Pediatric Medulloblastoma Links Catastrophic DNA Rearrangements with TP53 Mutations', *Cell*, 148(1), pp. 59–71. doi: 10.1016/j.cell.2011.12.013.
- Rocha, C. K. et al. (2011) '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.', *Molecular cytogenetics*. BioMed Central, 4(1), p. 8. doi: 10.1186/1755-8166-4-8.
- Rode, A. et al. (2016) 'Chromothripsis in cancer cells: An update', *International Journal of Cancer*. Wiley-Blackwell, 138(10), pp. 2322–2333. doi: 10.1002/ijc.29888.
- Roos, G. et al. (2008) 'Short telomeres are associated with genetic complexity, high-risk genomic aberrations, and short survival in chronic lymphocytic leukemia', *Blood*, 111(4), pp. 2246–2252. doi: 10.1182/blood-2007-05-092759.
- Rosati, E. et al. (2009) 'Constitutively activated Notch signaling is involved in survival and apoptosis resistance of B-CLL cells', *Blood*, 113(4), pp. 856–865. doi: 10.1182/blood-2008-02-139725.
- Rosenquist, R. et al. (2017) 'Genetic landscape and deregulated pathways in B-cell lymphoid malignancies', *Journal of Internal Medicine*. Wiley/Blackwell (10.1111), 282(5), pp. 371–394. doi: 10.1111/joim.12633.
- Rosenwald, A. et al. (2003) 'The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma', *Cancer Cell*. Cell Press, 3(2), pp. 185–197. doi: 10.1016/S1535-6108(03)00028-X.
- Rossi, D. et al. (2009) 'The Prognostic Value of TP53 Mutations in Chronic Lymphocytic Leukemia Is Independent of Del17p13: Implications for Overall Survival and Chemorefractoriness', *Clinical Cancer Research*, 15(3), pp. 995–1004. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1630.
- Rossi, D. et al. (2012) 'Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia.', *Blood*. American Society of Hematology, 119(12), pp. 2854–62. doi: 10.1182/blood-2011-12-395673.
- Rossi, D. et al. (2012) 'Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in

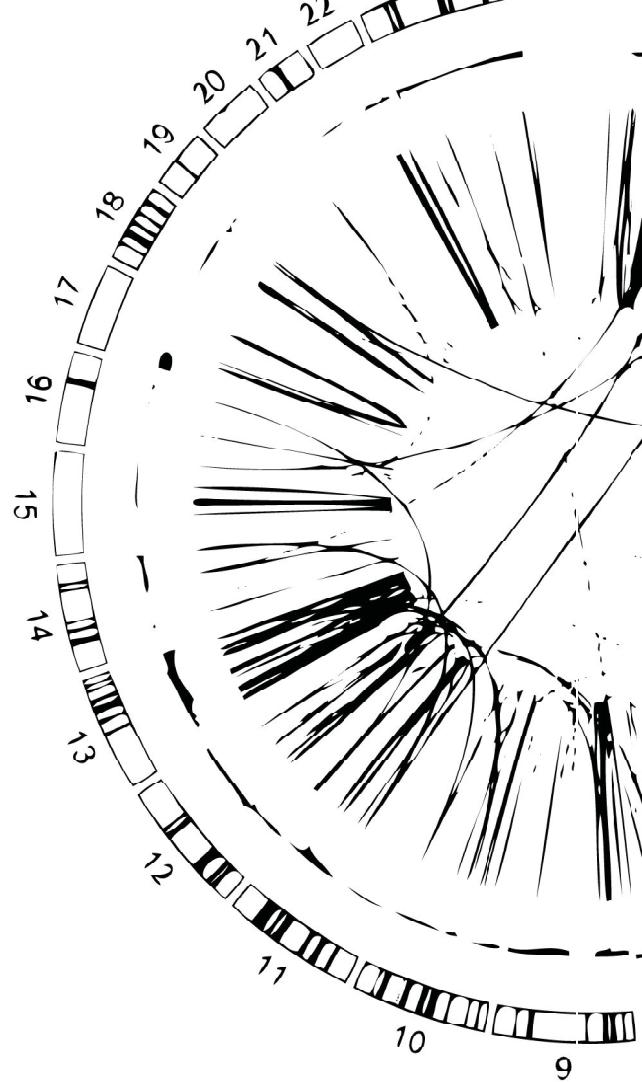
- chronic lymphocytic leukemia', *Blood*, 119(2), pp. 521–529. doi: 10.1182/blood-2011-09-379966.
- Rossi, D. et al. (2013) 'Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia', *Blood*, 121(8), pp. 1403–1412. doi: 10.1182/blood-2012-09-458265.
- Rossi, D. et al. (2014) 'Clinical impact of small TP53 mutated subclones in chronic lymphocytic leukemia', *Blood*, 123(14), pp. 2139–2147. doi: 10.1182/blood-2013-11-539726.
- Rossi, D. and Gaidano, G. (2012) 'ATM and chronic lymphocytic leukemia: mutations, and not only deletions, matter.', *Haematologica. Haematologica*, 97(1), pp. 5–8. doi: 10.3324/haematol.2011.057109.
- Royo, C. et al. (2011) 'Seminars in Cancer Biology The complex landscape of genetic alterations in mantle cell lymphoma', *Seminars in Cancer Biology*, 21, pp. 322–334. doi: 10.1016/j.semcan.2011.09.007.
- Royo, C. et al. (2012) 'Non-nodal type of mantle cell lymphoma is a specific biological and clinical subgroup of the disease', *Leukemia*, 2672(8), pp. 1895–1898. doi: 10.1038/leu.2012.72.
- Sabarinathan, R. et al. (2017) 'The whole-genome panorama of cancer drivers'. doi: 10.1101/190330.
- Salaverria, I. et al. (2008) 'Multiple Recurrent Chromosomal Breakpoints in Mantle Cell Lymphoma Revealed by a Combination of Molecular Cytogenetic Techniques', *GENES, CHROMOSOMES & CANCER*. doi: 10.1002/gcc.20609.
- Salaverria, I. et al. (2013) 'CCND2 rearrangements are the most frequent genetic events in cyclin D1(-) mantle cell lymphoma.', *Blood*, 121(8), pp. 1394–402. doi: 10.1182/blood-2012-08-452284.
- Sargent, R. et al. (2009) 'Customized oligonucleotide array-based comparative genomic hybridization as a clinical assay for genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia.', *The Journal of molecular diagnostics: JMD. American Society for Investigative Pathology*, 11(1), pp. 25–34. doi: 10.2353/jmoldx.2009.080037.
- Scaltriti, M. et al. (2011) 'Cyclin E amplification/overexpression is a mechanism of trastuzumab resistance in HER2⁺ breast cancer patients', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(9), pp. 3761–3766. doi: 10.1073/pnas.1014835108.
- Schultz, R. A. et al. (2011) 'Evaluation of chronic lymphocytic leukemia by BAC-based microarray analysis.', *Molecular cytogenetics. BioMed Central*, 4(1), p. 4. doi: 10.1186/1755-8166-4-4.
- Schwaenen, C. et al. (2004) 'Automated array-based genomic profiling in chronic lymphocytic leukemia: Development of a clinical tool and discovery of recurrent genomic

- alterations', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(4), pp. 1039–1044. doi: 10.1073/pnas.0304717101.
- Scott, D. W. et al. (2017) 'New Molecular Assay for the Proliferation Signature in Mantle Cell Lymphoma Applicable to Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Biopsies.', *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 35(15), pp. 1668–1677. doi: 10.1200/JCO.2016.70.7901.
- Sellmann, L. et al. (2007) 'Trisomy 19 is associated with trisomy 12 and mutated *IGHV* genes in B-chronic lymphocytic leukaemia', *British Journal of Haematology*, 138(2), pp. 217–220. doi: 10.1111/j.1365-2141.2007.06636.x.
- Shaffer, A. L., Rosenwald, A. and Staudt, L. M. (2002) 'Decision making in the immune system: Lymphoid Malignancies: the dark side of B-cell differentiation', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 2(12), pp. 920–933. doi: 10.1038/nri953.
- Shah, M. Y. et al. (2016) 'MMSET/WHSC1 enhances DNA damage repair leading to an increase in resistance to chemotherapeutic agents', *Oncogene*, 35(45), pp. 5905–5915. doi: 10.1038/onc.2016.116.
- Shen, M. M. (2013) 'Chromoplexy: a new category of complex rearrangements in the cancer genome', *Cancer cell*. doi: 10.1016/j.ccr.2013.04.025.
- Skowronska, A. et al. (2012) 'Biallelic ATM Inactivation Significantly Reduces Survival in Patients Treated on the United Kingdom Leukemia Research Fund Chronic Lymphocytic Leukemia 4 Trial', *Journal of Clinical Oncology*, 30(36), pp. 4524–4532. doi: 10.1200/JCO.2011.41.0852.
- Solé, F. et al. (2000) 'Translocation t(6;14)(p12;q32): a novel cytogenetic abnormality in splenic lymphoma with villous lymphocytes.', *British journal of haematology*, 110(1), pp. 241–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10931012> (Accessed: 27 August 2018).
- Sonoki, T. et al. (2001) 'Cyclin D3 is a target gene of t(6;14)(p21.1;q32.3) of mature B-cell malignancies.', *Blood*, 98(9), pp. 2837–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11675358> (Accessed: 27 August 2018).
- Spencer, J. and Dunn-Walters, D. K. (2005) 'Hypermutation at A-T base pairs: the A nucleotide replacement spectrum is affected by adjacent nucleotides and there is no reverse complementarity of sequences flanking mutated A and T nucleotides.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 175(8), pp. 5170–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16210621> (Accessed: 17 July 2018).
- Spruck, C. H., Won, K.-A. and Reed, S. I. (1999) 'Deregulated cyclin E induces chromosome instability', *Nature*, 401(6750), pp. 297–300. doi: 10.1038/45836.
- Stephens, P. J. et al. (2011) 'Massive Genomic Rearrangement Acquired in a Single Catastrophic Event during Cancer Development', *Cell*, 144(1), pp. 27–40. doi:

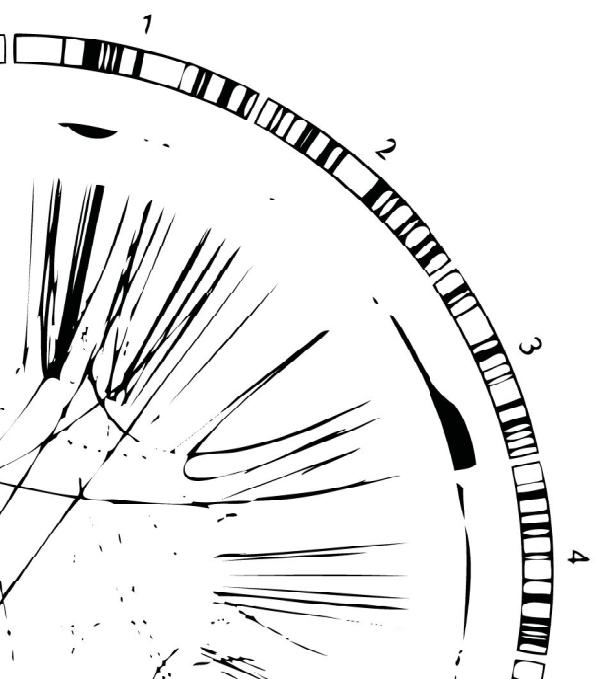
- 10.1016/j.cell.2010.11.055.
- Stilgenbauer, S. *et al.* (2014) 'Gene mutations and treatment outcome in chronic lymphocytic leukemia: results from the CLL8 trial', *Blood*, 123(21), pp. 3247–3254. doi: 10.1182/blood-2014-01-546150.
- Stratton, M. R. *et al.* (2009) 'The cancer genome', *Nature*, 458. doi: 10.1038/nature07943.
- Swerdlow, S. H. *et al.* (2016) 'The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms'. doi: 10.1182/blood-2016.
- Swerdlow, S. H., World Health Organization and International Agency for Research on Cancer (2017) *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. Available at: <http://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Who-Iarc-Classification-Of-Tumours/Who-Classification-Of-Tumours-Of-Haematopoietic-And-Lymphoid-Tissues-2017> (Accessed: 9 July 2018).
- Tang, B. *et al.* (2017) 'Advances in Genomic Profiling and Analysis of 3D Chromatin Structure and Interaction.', *Genes*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 8(9). doi: 10.3390/genes8090223.
- Truger, M. S. *et al.* (2015) 'Accumulation of adverse prognostic markers worsens prognosis in chronic lymphocytic leukaemia', *British Journal of Haematology*. Wiley/Blackwell (10.1111), 168(1), pp. 153–156. doi: 10.1111/bjh.13077.
- Ulvé, R. *et al.* (2017) 'Discovery of Human-Similar Gene Fusions in Canine Cancers', *Cancer Research*, 77(21), pp. 5721–5727. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-2691.
- Valentijn, L. J. *et al.* (2015) 'TERT rearrangements are frequent in neuroblastoma and identify aggressive tumors', *Nature Genetics*, 47(12), pp. 1411–1414. doi: 10.1038/ng.3438.
- Vegliante, M. C. *et al.* (2013) 'SOX11 regulates PAX5 expression and blocks terminal B-cell differentiation in aggressive mantle cell lymphoma.', *Blood*. American Society of Hematology, 121(12), pp. 2175–85. doi: 10.1182/blood-2012-06-438937.
- Villamor, N. *et al.* (2013) 'NOTCH1 mutations identify a genetic subgroup of chronic lymphocytic leukemia patients with high risk of transformation and poor outcome', *Leukemia*, 27(5), pp. 1100–1106. doi: 10.1038/leu.2012.357.
- Wang, L. *et al.* (2011) 'SF3B1 and Other Novel Cancer Genes in Chronic Lymphocytic Leukemia', *New England Journal of Medicine*, 365(26), pp. 2497–2506. doi: 10.1056/NEJMoa1109016.
- Wang, L. *et al.* (2016) 'Transcriptomic Characterization of SF3B1 Mutation Reveals Its Pleiotropic Effects in Chronic Lymphocytic Leukemia', *Cancer Cell*, 30(5), pp. 750–763. doi: 10.1016/j.ccr.2016.10.005.
- Warr, A. *et al.* (2015) 'Exome Sequencing: Current and Future Perspectives.', *G3 (Bethesda, Md.)*. Genetics Society of America, 5(8), pp. 1543–50. doi: 10.1534/g3.115.018564.

- Watanuki, J. et al. (2009) 'Bone marrow large B cell lymphoma bearing cyclin D3 expression: clinical, morphologic, immunophenotypic, and genotypic analyses of seven patients', *International Journal of Hematology*, 90(2), pp. 217–225. doi: 10.1007/s12185-009-0382-6.
- Weischenfeldt, J. et al. (2017) 'Pan-cancer analysis of somatic copy-number alterations implicates IRS4 and IGF2 in enhancer hijacking', *Nature Genetics*, 49(1), pp. 65–74. doi: 10.1038/ng.3722.
- Welzel, N. et al. (2001) '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 research*, 61(4), pp. 1629–36. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11245476> (Accessed: 3 July 2018).
- Wiestner, A. et al. (2007) 'Point mutations and genomic deletions in CCND1 create stable truncated cyclin D1 mRNAs that are associated with increased proliferation rate and shorter survival.', *Blood*. American Society of Hematology, 109(11), pp. 4599–606. doi: 10.1182/blood-2006-08-039859.
- Wiestner, A. (2013) 'Targeting B-Cell Receptor Signaling for Anticancer Therapy: The Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitor Ibrutinib Induces Impressive Responses in B-Cell Malignancies', *Journal of Clinical Oncology*, 31(1), pp. 128–130. doi: 10.1200/JCO.2012.44.4281.
- Wlodarska, I. et al. (2008) 'Translocations targeting CCND2, CCND3, and MYCN do occur in t(11;14)-negative mantle cell lymphomas', *Blood*, 111(12), pp. 5683–5690. doi: 10.1182/blood-2007-10-118794.
- Wren, D. et al. (2017) 'Comprehensive translocation and clonality detection in lymphoproliferative disorders by next-generation sequencing', *Haematologica*, 102(2), pp. e57–e60. doi: 10.3324/haematol.2016.155424.
- Wu, C. et al. (2016) 'Genetic heterogeneity in primary and relapsed mantle cell lymphomas: Impact of recurrent CARD11 mutations', *Oncotarget*, 7(25), pp. 38180–38190. doi: 10.18632/oncotarget.9500.
- Xu, R. et al. (2017) 'Circulating tumour DNA methylation markers for diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma', *Nature Materials*. Nature Publishing Group, 16(11), pp. 1155–1161. doi: 10.1038/nmat4997.
- Yang, L. et al. (2016) 'Analyzing Somatic Genome Rearrangements in Human Cancers by Using Whole-Exome Sequencing.', *American journal of human genetics*. Elsevier, 98(5), pp. 843–856. doi: 10.1016/j.ajhg.2016.03.017.
- Young, E. et al. (2017) 'EGR2 mutations define a new clinically aggressive subgroup of chronic lymphocytic leukemia', *Leukemia*. Nature Publishing Group, 31(7), pp. 1547–1554. doi: 10.1038/leu.2016.359.

- Yu, L. *et al.* (2017) 'Survival of Del17p CLL Depends on Genomic Complexity and Somatic Mutation.', *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. American Association for Cancer Research, 23(3), pp. 735–745. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0594.
- Zeng, W. *et al.* (2012) 'Cyclin D1-negative Blastoid Mantle Cell Lymphoma Identified by SOX11 Expression', *The American Journal of Surgical Pathology*, 36(2), pp. 214–219. doi: 10.1097/PAS.0b013e318241f050.
- Zenz, T. *et al.* (2008) 'Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up', *Blood*, 112(8), pp. 3322–3329. doi: 10.1182/blood-2008-04-154070.
- Zenz, T. *et al.* (2010) 'TP53 Mutation and Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia', *Journal of Clinical Oncology*, 28(29), pp. 4473–4479. doi: 10.1200/JCO.2009.27.8762.
- Zenz, T. *et al.* (2010) 'TP53 mutation profile in chronic lymphocytic leukemia: evidence for a disease specific profile from a comprehensive analysis of 268 mutations', *Leukemia*, 24(12), pp. 2072–2079. doi: 10.1038/leu.2010.208.
- Zhang, W. *et al.* (2010) 'B-cell activating factor and v-Myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (c-Myc) influence progression of chronic lymphocytic leukemia', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(44), pp. 18956–18960. doi: 10.1073/pnas.1013420107.
- Zimmerman, M. W. *et al.* (2018) 'MYC Drives a Subset of High-Risk Pediatric Neuroblastomas and Is Activated through Mechanisms Including Enhancer Hijacking and Focal Enhancer Amplification.', *Cancer discovery*, 8(3), pp. 320–335. doi: 10.1158/2159-8290.CD-17-0993.



ANNEXOS



Articles del grup

A gene signature that distinguishes conventional and leukemic nonnodal mantle cell lymphoma helps predict outcome.

Clot G, Jares P, Giné E, Navarro A, Royo C, Pinyol M, Martín-Garcia D, Demajo S, Espinet B, Salar A, Ferrer A, Muntañola A, Aymerich M, Rauert-Wunderlich H, Jaffe ES, Connors JM, Gascoyne RD, Delabie J, López-Guillermo A, Ott G, Wright GW, Staudt LM, Rosenwald A, Scott DW, Rimsza LM, Beà S, Campo E.

Abstract

Mantle cell lymphoma (MCL) is an aggressive B-cell malignancy, but some patients have a very indolent evolution. This heterogeneous course is related, in part, to the different biological characteristics of conventional MCL (cMCL) and the distinct subgroup of leukemic nonnodal MCL (nnMCL). Robust criteria to distinguish these MCL subtypes and additional biological parameters that influence their evolution are not well defined. We describe a novel molecular assay that reliably distinguishes cMCL and nnMCL using blood samples. We trained a 16-gene assay (L-MCL16 assay) on the NanoString platform using 19 purified leukemic samples. The locked assay was applied to an independent cohort of 70 MCL patients with leukemic presentation. The assay assigned 37% of cases to nnMCL and 56% to cMCL. nnMCL and cMCL differed in nodal presentation, lactate dehydrogenase, immunoglobulin heavy chain gene mutational status, management options, genomic complexity, and *CDKN2A/ATM* deletions, but the proportion with 17p/*TP53* aberrations was similar in both subgroups. Sequential samples showed that assay prediction was stable over time. nnMCL had a better overall survival (OS) than cMCL (3-year OS 92% vs 69%; $P = .006$) from the time of diagnosis and longer time to first treatment. Genomic complexity and *TP53/CDKN2A* aberrations predicted for shorter OS in the entire series and cMCL, whereas only genomic complexity was associated with shorter time to first treatment and OS in nnMCL. In conclusion, the newly developed assay robustly recognizes the 2 molecular subtypes of MCL in leukemic samples. Its combination with genetic alterations improves the prognostic evaluation and may provide useful biological information for management decisions.



Haematologica. 2017 Sep;102(9):e360-e363. doi: 10.3324/haematol.2016.160374. Epub 2017 May 18.

Improved classification of leukemic B-cell lymphoproliferative disorders using a transcriptional and genetic classifier.

Navarro A, Clot G, Martínez-Trillo A, Pinyol M, Jares P, González-Farré B, Martínez D, Trim N, Fernández V, Villamor N, Colomer D, Costa D, Salaverria I, **Martín-Garcia D**, Erber W, López C, Jayne S, Siebert R, Dyer MJS, Wiestner A, Wilson WH, Aymerich M, López-Guillermo A, Sánchez À, Campo E, Matutes E, Beà S.



Landscape of somatic mutations and clonal evolution in mantle cell lymphoma.

Beà S, Valdés-Mas R, Navarro A, Salaverria I, **Martín-Garcia D**, Jares P, Giné E, Pinyol M, Royo C, Nadeu F, Conde L, Juan M, Clot G, Vizán P, Di Croce L, Puente DA, López-Guerra M, Moros A, Roue G, Aymerich M, Villamor N, Colomo L, Martínez A, Valera A, Martín-Subero JI, Amador V, Hernández L, Rozman M, Enjuanes A, Forcada P, Muntañola A, Hartmann EM, Calasanz MJ, Rosenwald A, Ott G, Hernández-Rivas JM, Klapper W, Siebert R, Wiestner A, Wilson WH, Colomer D, López-Guillermo A, López-Otín C, Puente XS, Campo E.

Abstract

Mantle cell lymphoma (MCL) is an aggressive tumor, but a subset of patients may follow an indolent clinical course. To understand the mechanisms underlying this biological heterogeneity, we performed whole-genome and/or whole-exome sequencing on 29 MCL cases and their respective matched normal DNA, as well as 6 MCL cell lines. Recurrently mutated genes were investigated by targeted sequencing in an independent cohort of 172 MCL patients. We identified 25 significantly mutated genes, including known drivers such as ataxia-telangiectasia mutated (ATM), cyclin D1 (CCND1), and the tumor suppressor TP53; mutated genes encoding the anti-apoptotic protein BIRC3 and Toll-like receptor 2 (TLR2); and the chromatin modifiers WHSC1, MLL2, and MEF2B. We also found NOTCH2 mutations as an alternative phenomenon to NOTCH1 mutations in aggressive tumors with a dismal prognosis. Analysis of two simultaneous or subsequent MCL samples by whole-genome/whole-exome ($n = 8$) or targeted ($n = 19$) sequencing revealed subclonal heterogeneity at diagnosis in samples from different topographic sites and modulation of the initial mutational profile at the progression of the disease. Some mutations were predominantly clonal or subclonal, indicating an early or late event in tumor evolution, respectively. Our study identifies molecular mechanisms contributing to MCL pathogenesis and offers potential targets for therapeutic intervention.



Articles del consorci ICGC

Annexos

The reference epigenome and regulatory chromatin landscape of chronic lymphocytic leukemia.

Beekman R, Chapaprieta V, Russiñol N, Vilarrasa-Blasi R, Verdaguer-Dot N, Martens JHA, Duran-Ferrer M, Kulis M, Serra F, Javierre BM, Wingett SW, Clot G, Queirós AC, Castellano G, Blanc J, Gut M, Merkel A, Heath S, Vlasova A, Ullrich S, Palumbo E, Enjuanes A, Martín-García D, Beà S, Pinyol M, Aymerich M, Royo R, Puiggros M, Torrents D, Datta A, Lowy E, Kostadima M, Roller M, Clarke L, Flícek P, Agirre X, Prosper F, Baumann T, Delgado J, López-Guillermo A, Fraser P, Yaspo M Guigó R, Siebert R, Martí-Renom MA, Puente XS, López-Otín C, Gut I, Stunnenberg HG, Campo E, Martin-Subero JI.

Abstract

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a frequent hematological neoplasm in which underlying epigenetic alterations are only partially understood. Here, we analyze the reference epigenome of seven primary CLLs and the regulatory chromatin landscape of 107 primary cases in the context of normal B cell differentiation. We identify that the CLL chromatin landscape is largely influenced by distinct dynamics during normal B cell maturation. Beyond this, we define extensive catalogues of regulatory elements de novo reprogrammed in CLL as a whole and in its major clinico-biological subtypes classified by IGHV somatic hypermutation levels. We uncover that IGHV-unmutated CLLs harbor more active and open chromatin than IGHV-mutated cases. Furthermore, we show that de novo active regions in CLL are enriched for NFAT, FOX and TCF/LEF transcription factor family binding sites. Although most genetic alterations are not associated with consistent epigenetic profiles, CLLs with MYD88 mutations and trisomy 12 show distinct chromatin configurations. Furthermore, we observe that non-coding mutations in IGHV-mutated CLLs are enriched in H3K27ac-associated regulatory elements outside accessible chromatin. Overall, this study provides an integrative portrait of the CLL epigenome, identifies extensive networks of altered regulatory elements and sheds light on the relationship between the genetic and epigenetic architecture of the disease.



Clinical impact of the subclonal architecture and mutational complexity in chronic lymphocytic leukemia.

Nadeu F, Clot G, Delgado J, **Martín-García D**, Baumann T, Salaverria I, Beà S, Pinyol M, Jares P, Navarro A, Suárez-Cisneros H, Aymerich M, Rozman M, Villamor N, Colomer D, González M, Alcoceba M, Terol MJ, Navarro B, Colado E, Payer ÁR, Puente XS, López-Otín C, López-Guillermo A, Enjuanes A, Campo E.

Abstract

Genome studies of chronic lymphocytic leukemia (CLL) have revealed the remarkable subclonal heterogeneity of the tumors, but the clinical implications of this phenomenon are not well known. We assessed the mutational status of 28 CLL driver genes by deep-targeted next-generation sequencing and copy number alterations (CNA) in 406 previously untreated patients and 48 sequential samples. We detected small subclonal mutations (0.6-25% of cells) in nearly all genes (26/28), and they were the sole alteration in 22% of the mutated cases. CNA tended to be acquired early in the evolution of the disease and remained stable, whereas the mutational heterogeneity increased in a subset of tumors. The prognostic impact of different genes was related to the size of the mutated clone. Combining mutations and CNA, we observed that the accumulation of driver alterations (mutational complexity) gradually shortened the time to first treatment independently of the clonal architecture,IGHV status and Binet stage. Conversely, the overall survival was associated with the increasing subclonal diversity of the tumors but it was related to the age of patients, IGHV and TP53 status of the tumors. In conclusion, our study reveals that both the mutational complexity and subclonal diversity influence the evolution of CLL.



Genome-wide association analysis implicates dysregulation of immunity genes in chronic lymphocytic leukaemia.

Law PJ, Berndt SI, Speedy HE, Camp NJ, Sava GP, Skibola CF, Holroyd A, Joseph V, Sunter NJ, Nieters A, Bea S, Monnereau A, **Martin-Garcia D**, Goldin LR, Clot G, Teras LR, Quintela I, Birmann BM, Jayne S, Cozen W, Majid A, Smedby KE, Lan Q, Dearden C, Brooks-Wilson AR, Hall AG, Purdue MP, Mainou-Fowler T, Vajdic CM, Jackson GH, Cocco P, Marr H, Zhang Y, Zheng T, Giles GG, Lawrence C, Call TG, Liebow M, Melbye M, Glimelius B, Mansouri L, Glenn M, Curtin K, Diver WR, Link BK, Conde L, Bracci PM, Holly EA, Jackson RD, Tinker LF, Benavente Y, Boffetta P, Brennan P, Maynadie M, McKay J, Albanes D, Weinstein S, Wang Z, Caporaso NE, Morton LM, Severson RK, Riboli E, Vineis P, Vermeulen RC, Southee MC, Milne RL, Clavel J, Topka S, Spinelli JJ, Kraft P, Ennas MG, Summerfield G, Ferri GM, Harris RJ, Miligi L, Pettitt AR, North KE, Allsup DJ, Fraumeni JF, Bailey JR, Offit K, Pratt G, Hjalgrim H, Pepper C, Chanock SJ, Fegan C, Rosenquist R, de Sanjose S, Carracedo A, Dyer MJ, Catovsky D, Campo E, Cerhan JR, Allan JM, Rothman N, Houlston R, Slager S.

Abstract

Several chronic lymphocytic leukaemia (CLL) susceptibility loci have been reported; however, much of the heritable risk remains unidentified. Here we perform a meta-analysis of six genome-wide association studies, imputed using a merged reference panel of 1,000 Genomes and UK10K data, totalling 6,200 cases and 17,598 controls after replication. We identify nine risk loci at 1p36.11 (rs34676223, $P=5.04 \times 10^{-13}$), 1q42.13 (rs41271473, $P=1.06 \times 10^{-10}$), 4q24 (rs71597109, $P=1.37 \times 10^{-10}$), 4q35.1 (rs57214277, $P=3.69 \times 10^{-8}$), 6p21.31 (rs3800461, $P=1.97 \times 10^{-8}$), 11q23.2 (rs61904987, $P=2.64 \times 10^{-11}$), 18q21.1 (rs1036935, $P=3.27 \times 10^{-8}$), 19p13.3 (rs7254272, $P=4.67 \times 10^{-8}$) and 22q13.33 (rs140522, $P=2.70 \times 10^{-9}$). These new and established risk loci map to areas of active chromatin and show an over-representation of transcription factor binding for the key determinants of B-cell development and immune response.



Genetic Predisposition to Chronic Lymphocytic Leukemia Is Mediated by a BMF Super-Enhancer Polymorphism.

Kandaswamy R, Sava GP, Speedy HE, Beà S, Martín-Subero JI, Studd JB, Migliorini G, Law PJ, Puente XS, **Martín-García D**, Salaverria I, Gutiérrez-Abril J, López-Otín C, Catovsky D, Allan JM, Campo E, Houlston RS.

Abstract

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is an adult B cell malignancy. Genome-wide association studies show that variation at 15q15.1 influences CLL risk. We deciphered the causal variant at 15q15.1 and the mechanism by which it influences tumorigenesis. We imputed all possible genotypes across the locus and then mapped highly associated SNPs to areas of chromatin accessibility, evolutionary conservation, and transcription factor binding. SNP rs539846 C>A, the most highly associated variant ($p = 1.42 \times 10(-13)$, odds ratio = 1.35), localizes to a super-enhancer defined by extensive histone H3 lysine 27 acetylation in intron 3 of B cell lymphoma 2 (BCL2)-modifying factor (BMF). The rs539846-A risk allele alters a conserved RELA-binding motif, disrupts RELA binding, and is associated with decreased BMF expression in CLL. These findings are consistent with rs539846 influencing CLL susceptibility through differential RELA binding, with direct modulation of BMF expression impacting on anti-apoptotic BCL2, a hallmark of oncogenic dependency in CLL.



Clinical impact of clonal and subclonal TP53, SF3B1, BIRC3, NOTCH1, and ATM mutations in chronic lymphocytic leukemia.

Nadeu F, Delgado J, Royo C, Baumann T, Stankovic T, Pinyol M, Jares P, Navarro A, Martín-García D, Beà S, Salaverria I, Oldreive C, Aymerich M, Suárez-Cisneros H, Rozman M, Villamor N, Colomer D, López-Guillermo A, González M, Alcoceba M, Terol MJ, Colado E, Puente XS, López-Otín C, Enjuanes A, Campo E.

Abstract

Genomic studies have revealed the complex clonal heterogeneity of chronic lymphocytic leukemia (CLL). The acquisition and selection of genomic aberrations may be critical to understanding the progression of this disease. In this study, we have extensively characterized the mutational status of TP53, SF3B1, BIRC3, NOTCH1, and ATM in 406 untreated CLL cases by ultra-deep next-generation sequencing, which detected subclonal mutations down to 0.3% allele frequency. Clonal dynamics were examined in longitudinal samples of 48 CLL patients. We identified a high proportion of subclonal mutations, isolated or associated with clonal aberrations. TP53 mutations were present in 10.6% of patients (6.4% clonal, 4.2% subclonal), ATM mutations in 11.1% (7.8% clonal, 1.3% subclonal, 2% germ line mutations considered pathogenic), SF3B1 mutations in 12.6% (7.4% clonal, 5.2% subclonal), NOTCH1 mutations in 21.8% (14.2% clonal, 7.6% subclonal), and BIRC3 mutations in 4.2% (2% clonal, 2.2% subclonal). ATM mutations, clonal SF3B1, and both clonal and subclonal NOTCH1 mutations predicted for shorter time to first treatment irrespective of the immunoglobulin heavy-chain variable-region gene (IGHV) mutational status. Clonal and subclonal TP53 and clonal NOTCH1 mutations predicted for shorter overall survival together with the IGHV mutational status. Clonal evolution in longitudinal samples mainly occurred in cases with mutations in the initial samples and was observed not only after chemotherapy but also in untreated patients. These findings suggest that the characterization of the subclonal architecture and its dynamics in the evolution of the disease may be relevant for the management of CLL patients.



Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia.

Puente XS, Beà S, Valdés-Mas R, Villamor N, Gutiérrez-Abril J, Martín-Subero JI, Munar M, Rubio-Pérez C, Jares P, Aymerich M, Baumann T, Beekman R, Belver L, Carrio A, Castellano G, Clot G, Colado E, Colomer D, Costa D, Delgado J, Enjuanes A, Estivill X, Ferrando AA, Gelpí JL, González B, González S, González M, Gut M, Hernández-Rivas JM, López-Guerra M, **Martín-García D**, Navarro A, Nicolás P, Orozco M, Payer ÁR, Pinyol M, Pisano DG, Puente DA, Queirós AC, Quesada V, Romeo-Casabona CM, Royo C, Royo R, Rozman M, Russiñol N, Salaverría I, Stamatopoulos K, Stunnenberg HG, Tamborero D, Terol MJ, Valencia A, López-Bigas N, Torrents D, Gut I, López-Guillermo A, López-Otín C, Campo E.

Abstract

Chronic lymphocytic leukaemia (CLL) is a frequent disease in which the genetic alterations determining the clinicobiological behaviour are not fully understood. Here we describe a comprehensive evaluation of the genomic landscape of 452 CLL cases and 54 patients with monoclonal B-lymphocytosis, a precursor disorder. We extend the number of CLL driver alterations, including changes in ZNF292, ZMYM3, ARID1A and PTPN11. We also identify novel recurrent mutations in non-coding regions, including the 3' region of NOTCH1, which cause aberrant splicing events, increase NOTCH1 activity and result in a more aggressive disease. In addition, mutations in an enhancer located on chromosome 9p13 result in reduced expression of the B-cell-specific transcription factor PAX5. The accumulative number of driver alterations (0 to ≥ 4) discriminated between patients with differences in clinical behaviour. This study provides an integrated portrait of the CLL genomic landscape, identifies new recurrent driver mutations of the disease, and suggests clinical interventions that may improve the management of this neoplasia.



Genome-wide association study identifies multiple risk loci for chronic lymphocytic leukemia.

Berndt SI, Skibola CF, Joseph V, Camp NJ, Nieters A, Wang Z, Cozen W, Monnereau A, Wang SS, Kelly RS, Lan Q, Teras LR, Chatterjee N, Chung CC, Yeager M, Brooks-Wilson AR, Hartge P, Purdue MP, Birnbaum BM, Armstrong BK, Cocco P, Zhang Y, Severi G, Zeleniuch-Jacquotte A, Lawrence C, Burdette L, Yuenger J, Hutchinson A, Jacobs KB, Call TG, Shanafelt TD, Novak AJ, Kay NE, Liebow M, Wang AH, Smedby KE, Adami HO, Melbye M, Glimelius B, Chang ET, Glenn M, Curtin K, Cannon-Albright LA, Jones B, Diver WR, Link BK, Weiner GJ, Conde L, Bracci PM, Riby J, Holly EA, Smith MT, Jackson RD, Tinker LF, Benavente Y, Becker N, Boffetta P, Brennan P, Foretova L, Maynadie M, McKay J, Staines A, Rabe KG, Achenbach SJ, Vachon CM, Goldin LR, Strom SS, Lanasa MC, Spector LG, Leis JF, Cunningham JM, Weinberg JB, Morrison VA, Caporaso NE, Norman AD, Linet MS, De Roos AJ, Morton LM, Severson RK, Riboli E, Vineis P, Kaaks R, Trichopoulos D, Masala G, Weiderpass E, Chirlaque MD, Vermeulen RC, Travis RC, Giles GG, Albanez D, Virtamo J, Weinstein S, Clavel J, Zheng T, Holford TR, Offit K, Zelenetz A, Klein RJ, Spinelli JJ, Bertrand KA, Laden F, Giovannucci E, Kraft P, Kricker A, Turner J, Vajdic CM, Ennas MG, Ferri GM, Miligi L, Liang L, Sampson J, Crouch S, Park JH, North KE, Cox A, Snowden JA, Wright J, Carracedo A, Lopez-Otin C, Bea S, Salaverria I, Martin-Garcia D, Campo E, Fraumeni JF Jr, de Sanjose S, Hjalgrim H, Cerhan JR, Chanock SJ, Rothman N, Slager SL.

Abstract

Genome-wide association studies (GWAS) have previously identified 13 loci associated with risk of chronic lymphocytic leukemia or small lymphocytic lymphoma (CLL). To identify additional CLL susceptibility loci, we conducted the largest meta-analysis for CLL thus far, including four GWAS with a total of 3,100 individuals with CLL (cases) and 7,667 controls. In the meta-analysis, we identified ten independent associated SNPs in nine new loci at 10q23.31 (ACTA2 or FAS (ACTA2/FAS), $P=1.22\times10(-14)$), 18q21.33 (BCL2, $P=7.76\times10(-11)$), 11p15.5 (C11orf21, $P=2.15\times10(-10)$), 4q25 (LEF1, $P=4.24\times10(-10)$), 2q33.1 (CASP10 or CASP8 (CASP10/CASP8), $P=2.50\times10(-9)$), 9p21.3 (CDKN2B-AS1, $P=1.27\times10(-8)$), 18q21.32 (PMAIP1, $P=2.51\times10(-8)$), 15q15.1 (BMF, $P=2.71\times10(-10)$) and 2p22.2 (QPCT, $P=1.68\times10(-8)$), as well as an independent signal at an established locus (2q13, ACOXL, $P=2.08\times10(-18)$). We also found evidence for two additional promising loci below genome-wide significance at 8q22.3 (ODF1, $P=5.40\times10(-8)$) and 5p15.33 (TERT, $P=1.92\times10(-7)$). Although further studies are required, the proximity of several of these loci to genes involved in apoptosis suggests a plausible underlying biological mechanism.



Leukemia. 2013 Dec;27(12):2376-9. doi: 10.1038/leu.2013.127. Epub 2013 Apr 24.

Sporadic and reversible chromothripsis in chronic lymphocytic leukemia revealed by longitudinal genomic analysis.

Bassaganyas L, Beà S, Escaramís G, Tornador C, Salaverria I, Zapata L, Drechsel O, Ferreira PG, Rodriguez-Santiago B, Tubio JM, Navarro A, Martín-García D, López C, Martínez-Trillos A, López-Guillermo A, Gut M, Ossowski S, López-Otín C, Campo E, Estivill X.



Articles de col·laboracions

Expression of the transcribed ultraconserved region 70 and the related long non-coding RNA AC092652.2-202 has prognostic value in Chronic Lymphocytic Leukaemia.

Bomben R, Roisman A, D'Agaro T, Castellano G, Baumann T, Delgado J, López-Guillermo A, Zucchetto A, Dal-Bo M, Bravin V, Slavutsky I, Vlasova A, Guigó R, Martin-Subero JI, Chapaprieta V, Beekman R, **Martin-García D**, Beà S, Salaverria I, Aymerich M, Campo E, Gattei V, Hernández L.

A comprehensive flow-cytometry-based immunophenotypic characterization of Burkitt-like lymphoma with 11q aberration.

Rymkiewicz G, Grygalewicz B, Chechlinska M, Blachnio K, Bystydzienski Z, Romejko-Jarosinska J, Woroniecka R, Zajdel M, Domanska-Czyz K, **Martin-Garcia D**, Nadeu F, Swoboda P, Rygier J, Pienkowska-Grela B, Siwicki JK, Prochorec-Sobieszek M, Salaverria I, Siebert R, Walewski J.

Abstract

We previously described a subset of MYC translocation-negative aggressive B-cell lymphomas resembling Burkitt lymphoma, characterized by proximal gains and distal losses in chromosome 11. In the 2016 WHO classification, these MYC-negative lymphomas were recognized as a new provisional entity, 'Burkitt-like lymphoma with 11q aberration'. Here we present an immunophenotype analysis of Burkitt-like lymphomas with 11q aberration. Cells were acquired by fine needle aspiration biopsy from 10 young adult patients, 80% of whom presented recurrence-free 5-year survival. Twenty-three MYC-positive Burkitt lymphomas, including three carrying both MYC rearrangement and 11q aberration, served as controls. By immunohistochemistry, all Burkitt-like lymphomas with 11q aberration were CD20+/CD10+/BCL6+/BCL2-/MUM1-/MYC+/EBV-, usually LMO2+/CD44-/CD43- and sometimes CD56+, and showed high proliferation rate. By flow cytometry, Burkitt-like lymphoma with 11q aberration immunophenotypically resembled MYC-positive Burkitt lymphoma, except for significantly (adjusted $P<0.001$) more frequent CD38^{higher} expression in Burkitt lymphoma (91% MYC-positive Burkitt lymphoma vs 10% Burkitt-like lymphoma with 11q aberration), more frequently diminished CD45 expression in Burkitt lymphoma (74% vs 10%), an exclusive CD16/CD56 and highly restricted CD8 expression in Burkitt-like lymphoma with 11q aberration (60% vs 0% and 40% vs 4%, respectively). We showed high diagnostic accuracy and effectiveness of flow cytometry in Burkitt lymphoma. CD16/CD56 expression without CD38^{higher} and the lack of CD16/CD56 with CD38^{higher} expression proves to be a reliable, fast, and cost-effective method for diagnosing 11q aberration and MYC rearrangements in CD10(+) aggressive lymphomas, respectively. In addition, we confirmed a pattern of an inverted duplication with telomeric loss of 11q, as a recurrent 11q abnormality, but one case presented alternative changes, possibly resulting in an equivalent molecular effect. Our findings reveal similarities along with subtle but essential differences in the immunophenotype of Burkitt-like lymphoma with 11q aberration and MYC-positive Burkitt lymphoma, important for the differential diagnosis, but also for understanding the pathogenesis of Burkitt-like lymphoma with 11q aberration.



Integrating genomic alterations in diffuse large B-cell lymphoma identifies new relevant pathways and potential therapeutic targets.

Karube K, Enjuanes A, Dlouhy I, Jares P, Martin-Garcia D, Nadeu F, Ordóñez GR, Rovira J, Clot G, Royo C, Navarro A, Gonzalez-Farre B, Vaghefi A, Castellano G, Rubio-Perez C, Tamborero D, Briones J, Salar A, Sancho JM, Mercadal S, Gonzalez-Barca E, Escoda L, Miyoshi H, Ohshima K, Miyawaki K, Kato K, Akashi K, Mozos A, Colomo L, Alcoceba M, Valera A, Carrió A, Costa D, Lopez-Bigas N, Schmitz R, Staudt LM, Salaverria I, López-Guillermo A, Campo E.

Abstract

Genome studies of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) have revealed a large number of somatic mutations and structural alterations. However, the clinical significance of these alterations is still not well defined. In this study, we have integrated the analysis of targeted next-generation sequencing of 106 genes and genomic copy number alterations (CNA) in 150 DLBCL. The clinically significant findings were validated in an independent cohort of 111 patients. Germinal center B-cell and activated B-cell DLBCL had a differential profile of mutations, altered pathogenic pathways and CNA. Mutations in genes of the NOTCH pathway and tumor suppressor genes (TP53/CDKN2A), but not individual genes, conferred an unfavorable prognosis, confirmed in the independent validation cohort. A gene expression profiling analysis showed that tumors with NOTCH pathway mutations had a significant modulation of downstream target genes, emphasizing the relevance of this pathway in DLBCL. An in silico drug discovery analysis recognized 69 (46%) cases carrying at least one genomic alteration considered a potential target of drug response according to early clinical trials or preclinical assays in DLBCL or other lymphomas. In conclusion, this study identifies relevant pathways and mutated genes in DLBCL and recognizes potential targets for new intervention strategies.



Clinicopathological characteristics and genomic profile of primary sinonasal tract diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) reveals gain at 1q31 and RGS1 encoding protein; high RGS1 immunohistochemical expression associates with poor overall survival in DLBCL not otherwise specified (NOS).

Carreras J, Kikuti YY, Beà S, Miyaoka, Hiraiwa S, Ikoma H, Nagao R, Tomita S, Martin-Garcia D, Salaverria I, Sato A, Ichiki A, Roncador G, Garcia JF, Ando K, Campo E, Nakamura N.

Abstract

We aimed to define the clinicopathological characteristics of 29 primary sinonasal diffuse large B cell lymphoma (DLBCL^{sn}) in a series of 240 cases of DLBCL not otherwise specified [DLBCL^{all (NOS)}], including DLBCL^{sn} training set ($n = 11$) and validation set ($n = 18$), and DLBCL^{non-sn} ($n = 211$).

In the training set, 82% had a non-germinal center B-cell-like (Hans' Classifier) (non-GCB) phenotype and 18% were Epstein-Barr virus-encoded small RNAs (EBER)⁺. The genomic profile showed gains⁽⁺⁾ of 1q21.3q31.2 (55%), 10q24.1 (46%), 11q14.1 (46%) and 18q12.1q23 (46%); losses⁽⁻⁾ of 6q26q27 (55%) and 9p21.3 (64%); and copy number neutral loss of heterozygosity (LOH) (acquired uniparental disomy, UPD) at 6p25.3p21.31 (36%). This profile is comparable to DLBCL^{NOS} (GSE11318, $n = 203$) and closer to non-GCB/activated B-cell-like subtype (ABC). Nevertheless, +1q31, -9p21.3 and -10q11.1q26.2 were more characteristic of DLBCL^{sn} ($P < 0.001$). Array results were verified successfully by fluorescence in situ hybridization (FISH) on +1q21.3 (CKS1B), -6q26 (PARK2), +8q24.21 (MYC), -9p21.3 (MTAP, CDKN2A/B), -17p13.1 (TP53) and +18q21.33 (BCL2) with 82–91% agreement. Minimal common regions included biologically relevant genes of MNDA (+1q23.1), RGS1 and RGS13 (+1q31.2), FOXP1 (+3p13), PRDM1 (BLIMP1) and PARK2 (-6q21q26), MYC (+8q24.21), CDKN2A (-9p21.3), PTEN (-10q23.31), MDM2 (+12q15), TP53 (-17p13.1) and BCL2 (+18q21.33). Correlation between DNA copy number and protein immunohistochemistry was confirmed for RGS1, RGS13, FOXP1, PARK2 and BCL2. The microenvironment had high infiltration of M2-like tumour associated macrophages (TAMs) and CD8⁺ T lymphocytes that associated with higher genomic instability. The DLBCL^{sn} validation set confirmed the clinicopathological characteristics, all FISH loci and immunohistochemistry (IHC) for RGS1. RGS1, one of the most frequently altered genes, was analysed by IHC in DLBCL^{all} and high RGS1 expression associated with non-GCB, EBER⁺ and unfavourable overall survival (hazard ratio = 1.794; $P = 0.016$).

DLBCL^{sn} has a characteristic genomic profile. High RGS1 IHC expression associates with poor overall survival in DLBCL^{all (NOS)}.

High-resolution copy number analysis of paired normal-tumor samples from diffuse large B cell lymphoma.

Sebastián E*, Alcoceba M*, Martín-García D*, Blanco Ó, Sanchez-Barba M, Balanzategui A, Marín L, Montes-Moreno S, González-Barca E, Pardal E, Jiménez C, García-Álvarez M, Clot G, Carracedo Á, Gutiérrez NC, Sarasquete ME, Chillón C, Corral R, Prieto-Conde MI, Caballero MD, Salaverria I, García-Sanz R, González M.

Abstract

Copy number analysis can be useful for assessing prognosis in diffuse large B cell lymphoma (DLBCL). We analyzed copy number data from tumor samples of 60 patients diagnosed with DLBCL de novo and their matched normal samples. We detected 63 recurrent copy number alterations (CNAs), including 33 gains, 30 losses, and nine recurrent acquired copy number neutral loss of heterozygosity (CNN-LOH). Interestingly, 20 % of cases acquired CNN-LOH of 6p21 locus, which involves the HLA region. In normal cells, there were no CNAs but we observed CNN-LOH involving some key lymphoma regions such as 6p21 and 9p24.1 (5 %) and 17p13.1 (2.5 %) in DLBCL patients. Furthermore, a model with some specific CNA was able to predict the subtype of DLBCL, 1p36.32 and 10q23.31 losses being restricted to germinal center B cell-like (GCB) DLBCL. In contrast, 8p23.3 losses and 11q24.3 gains were strongly associated with the non-GCB subtype. A poor prognosis was associated with biallelic inactivation of TP53 or 18p11.32 losses, while prognosis was better in cases carrying 11q24.3 gains. In summary, CNA abnormalities identify specific DLBCL groups, and we describe CNN-LOH in germline cells from DLBCL patients that are associated with genes that probably play a key role in DLBCL development.

* Han contribuït per igual com a primers autors

