

DEPARTAMENTO DE ONCOLOGÍA Y HEMATOLOGÍA

IDENTIFICACIÓN DEL GEN MALT1 COMO ONCOGÉN  
DOMINANTE EN EL LINFOMA MALT

MARÍA DOLORES SÁNCHEZ IZQUIERDO

UNIVERSITAT DE VALENCIA  
Servei de Publicacions  
2005

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 25 de Febrer de 2005 davant un tribunal format per:

- D<sup>a</sup>. Rosa De Frutos Illán
- D. José Enrique Pérez Ortín
- D. Francesc Solé Ristol
- D. Juan Cruz Cigudosa García
- D. Antonio Fernández Izquierdo

Va ser dirigida per:

D. Francisco Javier García – Conde Bru

D. José Ángel Martínez Climent

©Copyright: Servei de Publicacions  
María Dolores Sánchez Izquierdo

---

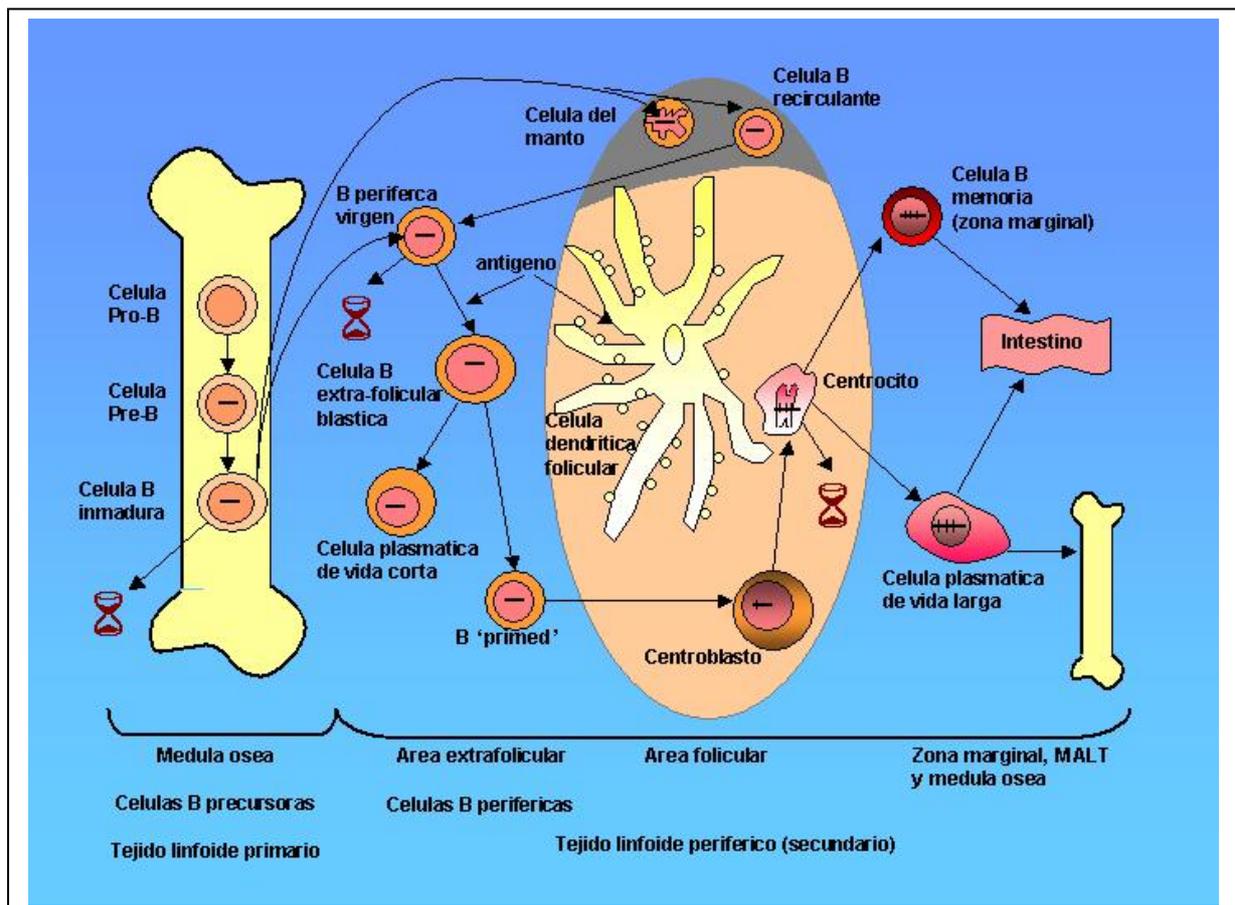
Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-6226-8

Edita: Universitat de València  
Servei de Publicacions  
C/ Artes Gráficas, 13 bajo  
46010 València  
Spain  
Telèfon: 963864115

# Identificación del gen *MALT1* como oncogén dominante en el linfoma MALT

María Dolores Sánchez Izquierdo TESIS  
Laboratorio de Citogenética Molecular  
Servicio de Hematología y Oncología Médica  
Hospital Clínico Universitario  
Universitat de València



TESIS DOCTORAL  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA  
DICIEMBRE 2004



# **Identificación del gen *MALT1* como oncogén dominante en el linfoma MALT**

María Dolores Sánchez Izquierdo  
Laboratorio de Citogenética Molecular  
Servicio de Hematología y Oncología Médica  
Hospital Clínico Universitario  
Departamento de Genética  
Universitat de València



## ***Agradecimientos:***

A los directores, por su asesoramiento y apoyo.

A los compañeros, por escuchar, recomendar, por compartir lo bueno y lo malo del día a día.

Al resto de enfermeras y médicos del Servicio, en especial a las que compartieron conmigo todos esos cariotipos en la sección de Citogenética.

A Martin Dyer, por darme esa gran oportunidad. Y a toda la gente del MRC Toxicology Unit, por enseñarme tanto y por valorarme aún más.

A la gente del departamento de Genética porque siempre me han recibido con los brazos abiertos.

A mis amigos, los mejores.

A mi padre, por ese entusiasmo en todo lo relacionado al mundo académico, y a Sara por estar ahí para todos.

A mi madre, por ser persistente y estar siempre ahí. A mi hermana, por su cariño infinito por todo.

A mis suegros y cuñada por adoptarme, escucharme y liberarme de las responsabilidades más diversas.

A Antonio, por su amor y paciencia. A Mario, por sonreírme...

Valencia, noviembre de 2004.



# *Contenidos*

<b>Abreviaturas</b>	<b>7</b>
<b>Introducción</b>	<b>9</b>
<b>GENÉTICA DE LOS LINFOMAS</b>	<b>11</b>
• Las traslocaciones que alteran la regulación génica	11
• Fusiones génicas	14
• Amplificaciones génicas	14
• La t(14;18)(q32;q21.3) y el linfoma folicular como paradigma de una alteración específica asociada al linfoma no Hodgkin.	15
<b>PATOGENIA MOLECULAR DEL LINFOMA MALT</b>	<b>17</b>
<b>RESUMEN DE RESULTADOS</b>	<b>21</b>
<b>ARTÍCULOS</b>	<b>23</b>
• Detection of translocations affecting the BCL6 locus in B cell non-Hodgkin's lymphoma by interphase fluorescence in situ hybridization.	25
• Genomic abnormalities acquired in the blastic transformation of splenic marginal zone B-cell lymphoma.	35
• <i>MALT1</i> is deregulated by both chromosomal translocation and amplification in B-cell non-Hodgkin lymphoma.	41
<b>RESULTADOS</b>	<b>49</b>
• Desarrollo de la técnica de FISH para la detección de traslocación y amplificación de oncogenes en el linfoma no Hodgkin B. Aplicación en pacientes para la caracterización molecular de la enfermedad.	49
• Identificación de una t(14;18)(q32;q21.3) que no afecta a <i>BCL2</i> en un paciente con linfoma MALT.	51
• La nueva traslocación t(14;18)(q32;q21.3) afecta al gen <i>MALT1</i> y no a <i>BCL2</i> en el linfoma MALT.	52

• El clonaje molecular de la nueva traslocación t(14;18)(q32;q21.3) ha permitido identificar el reordenamiento <i>MALTI-IGH</i> que produce la disregulación constitutiva de <i>MALTI</i> .	53
• <i>MALTI</i> se encuentra amplificado y sobreexpresado en el amplicón de la banda cromosómica 18q21 en linfomas no Hodgkin B.	55
• Alteraciones del gen <i>MALTI</i> en pacientes con LEZM y linfoma MALT.	57
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>59</b>
• Desarrollo de la técnica de FISH aplicable al análisis de los LNH-B.	59
• Detección de la t(14;18)(q32;q21) en un caso de linfoma MALT.	60
• Alteraciones moleculares características del linfoma MALT y posible función en la patología.	60
• La t(14;18)(q32;q21) en linfoma MALT implica al gen <i>MALTI</i> y aumenta su expresión.	62
• Especificidad de las diferentes alteraciones moleculares dentro de los linfomas MALT. Correlación con la localización de la enfermedad y la respuesta al tratamiento.	64
• Experiencias con la línea celular Ba/F3: capacidad de activación de NF-KB y de transformación oncogénica.	65
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>69</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>71</b>
<b>Notas</b>	<b>78</b>

## Abreviaturas utilizadas

aa	aminoácido.
ADN	ácido desoxirribonucleico.
ARNm	ácido ribonucleico mensajero.
BAC	cromosoma artificial bacteriano.
BCR	receptor células B ('B-cell receptor').
CSR	recombinación de la clase 'switch' de las inmunoglobulinas.
CGH	hibridación genómica comparada.
E $\mu$	secuencia correspondiente al 'enhancer' $\mu$ de las inmunoglobulinas.
FISH	hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia.
IG	inmunoglobulina.
IGH	cadena pesada de las inmunoglobulinas.
IGK	cadena ligera kappa de las inmunoglobulinas.
IGL	cadena ligera lambda de las inmunoglobulinas.
Kb	kilobase.
KDa	kiloDalton.
LDCGB	linfoma difuso de célula grande B.
LEZM	linfoma esplénico de la zona marginal.
LCF	linfoma folicular.
LCM	linfoma del manto.
LLC	leucemia linfática crónica.
LMALT	linfoma marginal del tejido linfoide asociado a mucosas.
LNH-B	linfoma no Hodgkin de células B.
Mb	megabase.
PAC	cromosoma artificial derivado de P1
pb	pares de bases.
PCR	reacción en cadena de la polimerasa.
RT-PCR	reacción en cadena de la polimerasa a partir de RNA retrotranscrito.
SHM	hipermutación somática.



## *Introducción*



## 1. GENÉTICA DE LOS LINFOMAS NO HODGKIN B

### Las traslocaciones que alteran la regulación génica

Los linfomas no Hodgkin de células B (LNH-B) constituyen un grupo de enfermedades con una gran variedad a nivel celular, molecular y clínico (Iaffe E.S. 2001). A pesar de esta heterogeneidad, los diferentes subgrupos de LNH-B comparten una característica esencial, que es la presencia de una traslocación cromosómica que afecta a uno de los genes reguladores de las inmunoglobulinas (IGs) (Rowley 1999; Willis and Dyer 2000; Dyer 2003). La traslocación es la consecuencia de errores que ocurren a nivel molecular durante el proceso natural de diferenciación de los linfocitos B, pudiendo suceder en cualquiera de los estadios evolutivos de las células B. En primer lugar, los precursores de células B sufren un proceso de diferenciación en la médula ósea para formar el receptor celular B (BCR). Este proceso contempla el reordenamiento molecular de los genes reguladores de las IGs (*IGH*, *IGK*, *IGL*), mediante la recombinación V(D)J, que implica la producción de rupturas de la doble cadena de ADN. Ocasionalmente, estas rupturas en el ADN no se reparan correctamente, dando lugar a una traslocación cromosómica. En ella, la secuencia reguladora normal de un determinado oncogén se sustituye típicamente por un elemento regulador inapropiado procedente de los genes reguladores de las IGs, lo que altera la expresión constitutiva del oncogén correspondiente. Los ejemplos más representativos son la traslocación entre los cromosomas 14 y 18 en el linfoma folicular (LCF), que afecta los genes *IGH* y *BCL2*, (Bakhshi, Jensen et al. 1985; Cleary and Sklar 1985) y la  $t(11;14)(q13;q32)$  en el linfoma de células del manto (LCM), que afecta al gen *CCND1* codificante de la ciclina D1 y a *IGH* (Rimokh, Berger et al. 1994). Estas traslocaciones cromosómicas pueden ocurrir en el proceso temprano de la diferenciación de la célula B (antes del reordenamiento  $D_H-J_H$ ), alterando por lo tanto a una célula 'naive' inmadura, como sucede en la mayoría de casos de LCM. También pueden aparecer más adelante en el proceso, tras el paso de la célula B por el centro germinal, de igual manera que ocurre en el LCF. Sin embargo, la  $t(14;18)(q32;q21)$  puede acontecer también en una célula B pregerminal, pese a lo cual ésta continúa el proceso de diferenciación y entra en el centro germinal, donde sufre el arresto postgerminal que inicia la transformación

neoplásica. En el centro germinal, suceden dos nuevos procesos de remodelación del ADN: la recombinación de las *IGs* ‘class-switch’ (CSR) y la hipermutación somática de las *IGs* (SHM) (Liu, Joshua et al. 1989; Liu, Malisan et al. 1996). Ambos procesos, CSR y SHM, generan nuevamente rupturas en el ADN que pueden por lo tanto dar lugar otra vez a una traslocación cromosómica. Un clásico ejemplo de un error durante la SHM es la t(8;14)(q24;q32) característica del linfoma de Burkitt endémico, donde el oncogén *MYC* se fusiona con secuencias de la región de *IGH* variable conteniendo mutaciones somáticas. Por el contrario, en el linfoma de Burkitt esporádico y en el mieloma múltiple, las traslocaciones cromosómicas afectan a puntos de ruptura en las regiones ‘switch’ del gen *IGH*, indicando un proceso anómalo de CSR (Pelicci, Knowles et al. 1986; Neri, Barriga et al. 1988). Las alteraciones oncogénicas resultantes de las traslocaciones pre y postgerminales son funcionalmente heterogéneas, y dependiendo del papel de los genes afectados resultan bien en un aumento de la proliferación celular, bien en el bloqueo de la diferenciación celular, o alternativamente, en la supresión de la apoptosis. Cualquiera de estas alternativas conducen a la transformación neoplásica.

Sin embargo, el acúmulo de otras alteraciones genéticas de forma secuencial es generalmente necesario para el desarrollo del linfoma. De hecho, los ratones transgénicos de *BCL2* y *CCND1* no desarrollan espontáneamente linfoma (McDonnell and Korsmeyer 1991; Lovec, Grzeschiczek et al. 1994). Además, se han descrito células portadoras de la t(14;18)(q32;q21) en la sangre periférica de sujetos sanos que no presentan linfoma (Summers, Goff et al. 2001). Estas anomalías genómicas adicionales afectan a dos tipos de genes:

- **oncogenes**, que resultan activados por mutación, traslocación o amplificación genómica, y codifican proteínas que promueven la proliferación celular; y
- **genes supresores tumorales**, que presentan disminución de su actividad a consecuencia de delección, mutación o silenciamiento epigenético, y codifican proteínas que regulan los procesos de apoptosis, control del ciclo celular, proliferación y diferenciación celular, y reparación del ADN (Hanahan and Weinberg 2000)

Linfoma	Gen	Función	Alteración	Frecuencia
LCF	<i>BCL2</i>	Inhibición de la apoptosis.	t(14;18)(q32;q21)	70-90%
	<i>FCGR1IB</i>	Diferenciación de células B en CG.	t(1;22)(q22;q11)	<1%
LDCGB	<i>BCL6</i>	Diferenciación y activación de células B, inflamación, control del ciclo celular e inhibición de la apoptosis.	t(3;N)(q27;N)	30-40%
	<i>BCL2</i>	Inhibición de la apoptosis.	t(14;18)(q32;q21)	20%
	<i>MYC</i>	Diferenciación y metabolismo de células B, adhesión, control del ciclo celular e inducción de apoptosis.	t(8;14)(q24;q32)	80%
			t(8;22)(q24;q11)	15%
			t(2;8)(p12;q24)	5%
	<i>BCL8</i>	Función desconocida.	t(14;15)(q32;q11-13)	<1%
	<i>IRTA1</i>	Homología con receptor Fc.	t(1;14)(q21;q32)	<1%
<i>NFKB2</i>	Factor de transcripción con diferentes funciones.	t(10;14)(q24;q32)	<1%	
LCM	<i>CCND1</i>	Paso de G1 a S.	t(11;14)(q13;q32)	90%
LLBD	<i>BCL3</i>	Activación de NF-KB.	t(14;19)(q32;q13)	<1%
LLC	<i>BCL2</i>	Inhibición de la apoptosis.	t(14;18)(q32;q21)	1-2%
	<i>BCL11A</i>	Función desconocida.	t(2;14)(p13;q32)	<1%
LLP	<i>PAX5</i>	Regulación de la diferenciación en linfocitos.	t(9;14)(p13;q32)	50%
LB	<i>MYC</i>	Diferenciación y metabolismo de células B, adhesión, control del ciclo celular e inducción de apoptosis.	t(8;14)(q24;q32)	80%
			t(8;22)(q24;q11)	10%
			t(2;8)(p12;q24)	10%
LMALT	<i>BCL10</i>	Transducción de la señal de BCR.	t(1;14)(q22;q32)	<5%
	<i>API2/MALT1</i>	Inhibición de la apoptosis.	t(11;18)(q21;q21)	30-50%
LEZM	<i>CDK6</i>	Control de ciclo celular.	t(7;14)(q21;q32), t(2;7)(p12;q21)	<5%
LNH-B	<i>PAFAH2</i>	Acetilhidrolasa del factor activador de plaquetas.	t(1;14)(p34;q32)	<1%
	<i>RCK</i>	RNA helicasa.	t(11;14)(q23;q32)	<1%
	<i>BCL7A</i>	Función desconocida.	t(12;14)(q24;q32)	<1%
	<i>CCND2</i>	Paso de G1 a S.	t(11;22)(q13;q11)	<1%
	<i>BCL9</i>	Señalización de WNT (desarrollo embrionario).	t(1;14)(q21;q32)	<1%
	<i>MUC1</i>	Glicoproteína de membrana, adhesión celular.	t(1;14)(q21;q32)	<1%
Mieloma	<i>CCND1</i>	Paso de G1 a S.	t(11;14)(q13;q32)	20-25%
	<i>FGFR3</i>	Activación de la división celular.	t(4;14)(p16;q32)	20-25%
	<i>MMSET</i>	Síndrome Wolf-Hirschhorn.	t(4;14)(p16;q32)	#
	<i>IRF4</i>	Regulación de la apoptosis.	t(6;14)(p25;q32)	20%
	<i>C-MAF</i>	Regulación de la diferenciación celular.	t(14;16)(q32;q23)	20-25%
	<i>MUM2/3</i>	Función desconocida.	t(1;14)(q21;q32)	<5%

Tabla 1: Reordenamientos cromosómicos característicos de LNH-B y mieloma múltiple que afectan a genes implicados en apoptosis o en regulación del ciclo celular. LCF linfoma folicular, LDCGB linfoma difuso de célula grande B, LCM linfoma del manto, LLC leucemia linfática crónica, LLBD, linfoma linfocítico bien diferenciado, LLP; linfoma linfoplasmacítico, LB linfoma Burkitt, LMALT linfoma extranodal asociado a mucosas, LSZM linfoma esplénico de la zona marginal. CG: centro germinal. N: diferentes puntos de ruptura. # Como la traslocación es la misma, la frecuencia es considerada conjuntamente para ambos genes.

El patrón y la secuencia de las alteraciones de estos oncogenes y genes supresores contribuyen definitivamente al fenotipo tumoral, a la respuesta terapéutica, y a la evolución clínica de los pacientes con LNH-B (Tabla 1).

### **Fusiones génicas**

Con una menor frecuencia, los LNH-B presentan otro tipo de traslocaciones cromosómicas que fusionan dos oncogenes, dando lugar a un ARN mensajero y proteína quiméricos con capacidad de transformación neoplásica. Tal es el caso de la  $t(2;5)(p23;q25)$ , que fusiona el gen de la fosfoproteína nucleolar en el cromosoma 5q35 al gen de la proteína tirosina quinasa descrita por primera vez al descubrirse este reordenamiento, *ALK* (de kinasa del linfoma anaplásico), en el cromosoma 2p23. La proteína híbrida generada contiene la parte N terminal de *NPM* unida al dominio catalítico de la kinasa y resulta en la generación del linfoma anaplásico (Morris, Kirstein et al. 1994).

### **Amplificaciones génicas**

La amplificación génica es otro mecanismo de reordenamiento molecular frecuente en tumores sólidos y hematológicos, que se asocia frecuentemente con progresión tumoral y resistencia al tratamiento (Schwab and Amler 1990; Werner, Dohner et al. 1997). En el caso del linfoma difuso de células grande B (LDCGB), la amplificación genómica puede presentarse en el 50% de los casos (Rao, Houldsworth et al. 1998). Las regiones cromosómicas que muestran frecuente amplificación son 2p16, 3q27, 8q24, 12q12-q14, 13q31-q32 y 18q21. Estas regiones corresponden en muchos casos a *loci* de oncogenes implicados en los LNH-B mediante traslocación cromosómica, tales como *BCL2* en 18q21, *BCL6* en 3q27, *MYC* en 8q24, y *MUC1* en 1q21 (Dyomin, Palanisamy et al. 2000), aunque también pueden afectar a *loci* de otros genes tales como *REL* en 2p16 (factor de transcripción), *CDK2-CDK4* en 12q12-q14 (quinasas reguladoras del ciclo celular) y *MDM2* (inhibidor de *P53*) (Rao, Houldsworth et al. 1998). El incremento en la expresión de oncogenes en la célula tumoral como consecuencia de la amplificación a nivel del ADN supone un mecanismo funcionalmente similar al de las traslocaciones cromosómicas en los LNH-B (Ben-Yehuda, Houldsworth et al. 1994; Werner, Dohner et al. 1997). El estudio detallado de

la estructura de los amplicones ha resultado en la mayoría de casos compleja, siendo el resultado de variados mecanismos citogenéticos (duplicaciones en tandem, traslocaciones no balanceadas, inserciones, ‘homogeneously stained regions’ (hsr) y ‘double minutes’), que dan lugar a un incremento regional del número de copias de ADN (Schneider, Hiemstra et al. 1992; Akiyama, Kanda et al. 1994; Manohar, Salwen et al. 1995; Monni, Joensuu et al. 1997; Pandita, Godbout et al. 1997; Wu, Sinclair et al. 2000). Esta ganancia de material genómico produce un incremento en la expresión de genes comprendidos dentro de la región amplificada, generalmente alterando no solamente a uno sino a varios de ellos (Martinez-Climent, Alizadeh et al. 2003). Tal complejidad hace difícil el análisis de los amplicones en linfomas, y en muchos de ellos los genes “diana” aún no han podido ser identificados.

### **La traslocación t(14;18)(q32;q21) y el linfoma folicular como paradigma de una alteración asociada al linfoma no Hodgkin.**

Una de las alteraciones mejor caracterizada y frecuente en los LNH-B es la que afecta al oncogén *BCL2*. De hecho, este *locus* fue identificado originalmente por su implicación en el LCF a través de su presencia en la traslocación t(14;18)(q32;q21) (Fukuhara, Rowley et al. 1979). El LCF se caracteriza en un 80-98% de los casos por dicha traslocación (Offit and Chaganti 1991), que sitúa a *BCL2* bajo el control del ‘enhancer’ E $\mu$  de *IGH*, y resulta en la sobreexpresión constitutiva del producto correspondiente, una proteína con función antiapoptótica y estructuralmente normal (Bakhshi, Jensen et al. 1985) (Cleary and Sklar 1985). La inhibición del proceso de apoptosis resultante de esta sobreexpresión representa probablemente el primer paso en el desarrollo del tumor. Sin embargo, según datos obtenidos del estudio de modelos animales transgénicos, la sobreexpresión de *BCL2 per se* no es suficiente para el desarrollo del linfoma, pero la inhibición del proceso de apoptosis favorece la acumulación secuencial de lesiones genéticas que finalmente conducen a la formación del tumor (Vaux, Cory et al. 1988; McDonnell, Deane et al. 1989).

*BCL2*, en la banda 18q21.3, se sitúa en una orientación telómero-centrómero y posee tres exones, el primero de los cuales no es codificante y se separa del resto del gen por un gran intrón de 225 Kb. El gen contiene dos promotores diferentes: P1, situado en 5’ y P2, situado 1.3 Kb aguas abajo de P1, y que raramente es activado (Seto,

Jaeger et al. 1988). *BCL2* codifica para una proteína de 26 KDa que inhibe la ruta mitocondrial de apoptosis. La mayoría de las traslocaciones en el LCF (70%) ocurren en el extremo 3' no traducido del gen, en una región común denominada MBR (de 'Major Breakpoint Region'), de un tamaño de secuencia de 150 pb. Con menor frecuencia se encuentran traslocaciones 30 Kb aguas abajo en sentido telomérico del *locus* de *BCL2* en el llamado mcr ('minor cluster region'), de unas 500 pb (Cleary, Galili et al. 1986). En la clínica se conoce el valor diagnóstico y pronóstico del estudio cualitativo y cuantitativo del reordenamiento *BCL2-IGH*, y de la sobreexpresión de *BCL2* en pacientes con LCF y LDCGB (Bea, Ribas et al. 1999; Lopez-Guillermo, Cabanillas et al. 1999) (Buchonnet, Jardin et al. 2002).

Los reordenamientos citogenéticos de la banda cromosómica 18q21 no han sido solamente descritos en el LCF y el LDGCB, sino también en otros tipos de LNH-B. En la mayoría de casos, los puntos de ruptura afectan al *locus* de *BCL2*. Existen evidencias de que otros genes diferentes de *BCL2* podrían estar afectados por estos reordenamientos. La amplificación de esta banda genómica ha sido descrita también en linfomas del sistema nervioso central, sin que se detecte sobreexpresión de la proteína *BCL2* (Weber, Weber et al. 2000). El LCM presenta amplificación de 18q21, aunque la implicación de *BCL2* resulta controvertida. En este sentido, Bentz y cols. muestran por hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) y Southern blot que el gen se encuentra amplificado en dos de los cinco casos con amplificación (Bentz, Plesch et al. 2000) mientras que Bea y cols. no encuentran tal correlación en otra serie de pacientes con LCM (Bea, Ribas et al. 1999). En un estudio utilizando hibridación genómica comparada (CGH), una técnica que permite la identificación de alteraciones regionales en el número de copias de ADN mediante la comparación del genoma tumoral frente a un genoma control diploide y llevado a cabo en el linfoma marginal del tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT) extranodal, tres casos mostraron ganancias en 18q21, aunque la posible implicación de *BCL2* no fue analizada (Barth, Bentz et al. 2001). Por otro lado, existen traslocaciones de 18q21 en el LF con un punto de ruptura telomérico (5') a *BCL2*, que afecta al gen denominado *FVT-1* (de 'Follicular Variant Translocation'), aunque este tipo de traslocación es infrecuente (Rimokh, Gadoux et al. 1993). Estos datos sugieren que ciertos reordenamientos de la banda 18q21 podrían afectar puntos de ruptura distintos del *locus BCL2* y, como consecuencia, alterar uno o varios genes cercanos. Otra traslocación frecuente en linfomas afectando a la región

18q21 es la t(11;18)(q21;q21) característica del linfoma MALT (Auer, Gascoyne et al. 1997; Ott, Katzenberger et al. 1997) (Rosenwald, Ott et al. 1999). Esta traslocación fusiona los genes *API2* (*c-IAP2*) y *MALT1* generando una proteína quimérica de fusión con posible actividad antiapoptótica (Dierlamm, Baens et al. 1999) (Morgan, Yin et al. 1999).

## 2. PATOGENIA MOLECULAR DEL LINFOMA MALT

El linfoma MALT es un linfoma extranodal que constituye el 7% de todos los LNH-B. Tras el LCF y el LDCGB, constituye el tercer linfoma en orden de frecuencia, siendo por ejemplo más común que el LCM y el linfoma de Burkitt. Sin embargo, a pesar de su relativa frecuencia, la patogenia molecular del linfoma MALT no se ha estudiado como en otros LNH-B.

El 50% de los linfomas MALT son gastrointestinales, aunque otras localizaciones incluyen pulmón, cabeza y cuello, anexos oculares, piel, tiroides y mama (Isaacson PG 2001). Frecuentemente, los pacientes con linfoma MALT presentan una historia clínica de inflamación crónica o enfermedad auto inmune, como la gastritis crónica asociada a infección por *Helicobacter pylori*, el síndrome de Sjögren, o la tiroiditis de Hashimoto (Cavalli, Isaacson et al. 2001; Isaacson PG 2001) (Montalban, Manzanal et al. 1995) (Zucca, Bertoni et al. 2003). En general, el linfoma MALT presenta un curso indolente y responde bien al tratamiento local (cirugía y/o radioterapia) más antibiótico terapia para la erradicación de *H. pylori* (Montalban, Manzanal et al. 1995; Iaffe E.S. 2001; Zucca, Bertoni et al. 2003). No obstante, un subgrupo de pacientes evoluciona de forma agresiva y precisa quimioterapia. Histológicamente, el linfoma MALT se caracteriza por una proliferación de células linfoides de la zona marginal como consecuencia del estímulo antigénico crónico generado por la infección persistente o el proceso autoinmune, formando lesiones linfoepiteliales y colonizando folículos linfoides reactivos. Desde el punto de vista citogenético, el linfoma MALT presenta varias traslocaciones cromosómicas distintivas. La primera es la t(1;14)(p22;q32), observada en casos aislados, y que produce la yuxtaposición del oncogén *BCL10* con el 'enhancer' del gen *IGH* (Willis, Jadayel et al. 1999) (Zhang, Siebert et al. 1999). *BCL10* codifica una proteína de 233 aminoácidos

(aas) que contiene un dominio CARD ('caspase recruitment domain') característico de las proteínas pro y antiapoptóticas, y se expresa en numerosos tejidos aunque con una baja expresión. La traslocación resulta en una expresión aumentada principalmente en el núcleo de la célula tumoral (Willis, Jadayel et al. 1999; Zhang, Siebert et al. 1999). La figura 1 de la introducción (figura I1) muestra un esquema de los dominios de la proteína. *BCL10* promueve apoptosis aunque de una forma poco significativa, y es capaz de activar *NF-KB* a la vez que suprime la transformación de células en cultivo. En tejido linfático no tumoral *BCL10* se localiza en el citoplasma, pero en algunos linfomas MALT se encuentra parcialmente expresada en el núcleo, independientemente de la presencia de la traslocación. A pesar de ello, su expresión es mayor en aquellos linfomas con este reordenamiento. Algunas mutaciones de *BCL10* producen proteínas aberrantes incapaces de inducir apoptosis pero con capacidad de activación de *NF-KB*. Estudios llevados a cabo en el ratón transgénico mutante nulo para *BCL10* muestran un papel importante de esta molécula en la activación y proliferación linfoide, además de en la formación de tubo neural (Ruland, Duncan et al. 2001). Los linfocitos *BCL10* *-/-* son incapaces de activar la ruta *NF-KB* en respuesta a diferentes estímulos específicos indicando que *BCL10* es el puente entre los receptores antigénicos linfoides y la ruta de *NF-KB* (Ruland, Duncan et al. 2001).

Un segundo subgrupo de pacientes con linfoma MALT presenta otra traslocación característica, la ya mencionada t(11;18)(q22;q22), detectada en un 30% de los linfomas MALT (fundamentalmente gástricos), y que resulta en la fusión quimérica de *API2* (también denominado *HIAP1*, *CIAP2* o *BIRC3*) en 11q22 y *MALT1* en 18q21.3 (Dierlamm, Baens et al. 1999; Rosenwald, Ott et al. 1999). En esta traslocación se genera una proteína quimérica de fusión con posible actividad antiapoptótica, donde *API2* parece desempeñar el papel primordial en la patogenia del linfoma (Dierlamm, Baens et al. 1999). Algunos de estos casos muestran una delección asociada a la traslocación que afecta a la región 3' del gen *API2*, lo que implica la pérdida del transcrito localizado en el cromosoma derivativo 18. El producto de fusión generado en el derivativo 11q22 se considera el responsable patogénico de la traslocación.

La proteína *API2* contiene entre uno y tres motivos BIR ('baculovirus inhibitor of apoptosis repeat'), un dominio CARD y un dominio C-terminal de unión a dedo de zinc ('zinc-binding RING finger'). Se ha demostrado que algunas proteínas de la familia

IAP ('inhibitor of apoptosis') son capaces de inhibir eficazmente diferentes caspasas mediante la interacción con proteínas TRAF ('TNF-associated factor') y, por tanto, presentan capacidad de inhibición de la apoptosis. Debido a que el motivo BIR se conserva intacto en la traslocación, se cree que juega un papel determinante en la función del producto de fusión 5'*API2-MALT1*'. Los linfomas que presentan la traslocación t(11;18)(q21;q21) muestran frecuentemente expresión de BCL10 en el núcleo aunque con una intensidad menor que los casos con traslocación t(1;14)(p22;q32) (Dyomin, Palanisamy et al. 2000; Ye, Dogan et al. 2000; Liu, Ye et al. 2001).

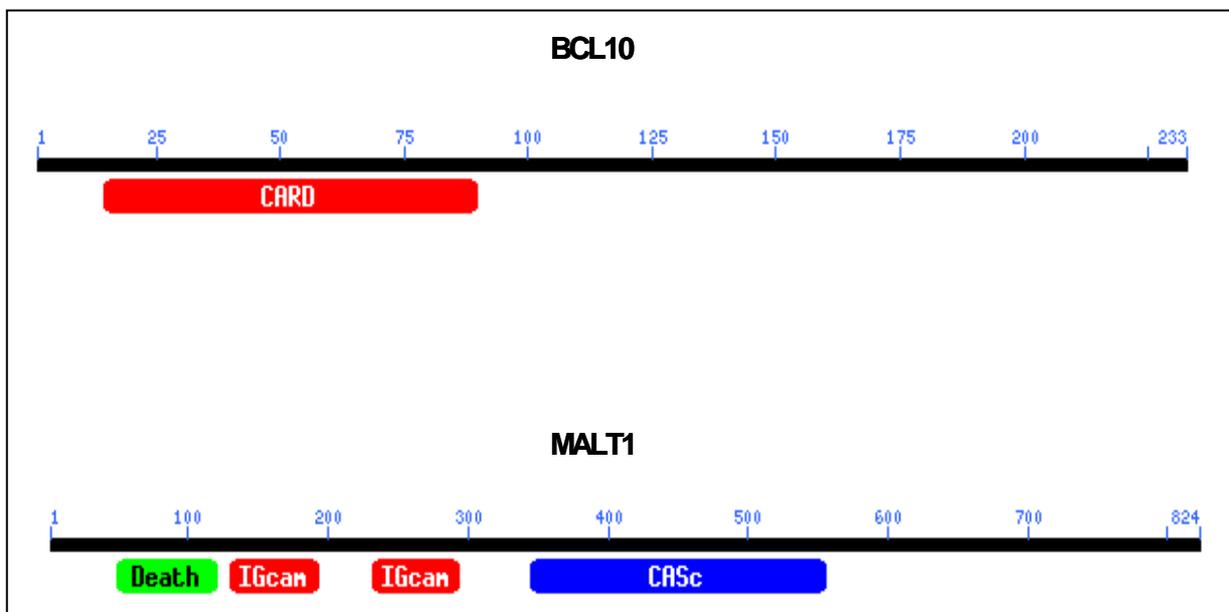


Figura II: Dominios de las proteínas BCL10 (233 aa) y MALT1 (824 aa). CARD: 'Caspase recruitment domain'. Death: dominio de muerte celular. IGcam: dominio IG, subfamilia molécula de adhesión celular. CASc: Caspasa, homólogo de ICE ('interleukin-1 beta converting enzyme').

Estudios llevados a cabo utilizando diferentes constructos de *MALT1* y *BCL10*, genes participantes en las traslocaciones características del linfoma MALT, demuestran que ambas moléculas pueden interactuar y cooperar en la activación del factor de transcripción *NF-KB* (Uren, O'Rourke et al. 2000). MALT1 es una paracaspasa que tiene dos dominios de muerte, dos dominios similares a inmunoglobulinas, y un dominio similar a caspasa, pero carece de dominio CARD (figura II). Tanto la

oligomerización de *MALT1* mediada por *BCL10* como la proteína de fusión *API2-MALT1* activan la ruta *NF-KB* que promueve la división celular y, por tanto, la progresión del tumor (Lucas, Yonezumi et al. 2001).

## ***RESUMEN DE RESULTADOS***



*ARTÍCULOS*



**Artículo 1: páginas 25 a 34 de la tesis doctoral**

**Detection of translocations affecting the BCL6 locus in B cell non-Hodgkin's lymphoma by interphase fluorescence in situ hybridization.**

Sanchez-Izquierdo D, Siebert R, Harder L, Marugan I, Gozzetti A, Price HP, Gesk S, Hernandez-Rivas JM, Benet I, Sole F, Sonoki T, Le Beau MM, Schlegelberger B, Dyer MJ, Garcia-Conde J, Martinez-Climent JA. *Leukemia*. 2001 Sep;15(9):1475-84

**Artículo 2: páginas 35 a 40 de la tesis doctoral**

**Genomic abnormalities acquired in the blastic transformation of splenic marginal zone B-cell lymphoma.**

Martinez-Climent JA, Sanchez-Izquierdo D, Sarsotti E, Blesa D, Benet I, Climent J, Vizcarra E, Marugan I, Terol MJ, Sole F, Cigudosad JC, Siebert R, Dyer MJ, Garcia-Conde J. *Leuk Lymphoma*. 2003 Mar;44(3):459-64.

**Artículo 3: páginas 41 a 48 de la tesis doctoral**

***MALT1* is deregulated by both chromosomal translocation and amplification in B-cell non-Hodgkin lymphoma.**

Sanchez-Izquierdo D, Buchonnet G, Siebert R, Gascoyne RD, Climent J, Karran L, Marin M, Blesa D, Horsman D, Rosenwald A, Staudt LM, Albertson DG, Du MQ, Ye H, Marynen P, Garcia-Conde J, Pinkel D, Dyer MJ, Martinez-Climent JA. *Blood*. 2003 Jun 1;101(11):4539-46

## RESULTADOS

**Desarrollo de la técnica de FISH para la detección de traslocación y amplificación de oncogenes en linfoma no Hodgkin B. Aplicación en pacientes para la caracterización molecular de la enfermedad.**

### Artículo 1:

**Detection of translocations affecting the *BCL6* locus in B cell non-Hodgkin's lymphoma by interphase fluorescence in situ hybridization.**

Sanchez-Izquierdo D, Siebert R, Harder L, Marugan I, Gozzetti A, Price HP, Gesk S, Hernandez-Rivas JM, Benet I, Sole F, Sonoki T, Le Beau MM, Schlegelberger B, Dyer MJ, Garcia-Conde J, Martinez-Climent JA. *Leukemia*. 2001 Sep;15(9):1475-84

Para una detallada caracterización de los puntos de ruptura en las traslocaciones cromosómicas de los LNH-B, se ha desarrollado la técnica de FISH usando como sondas genómicas BACs ('bacterial artificial chromosomes') y PACs ('P1-derived artificial chromosomes'). Estas sondas tienen un tamaño de 100-300 Kb y actualmente es posible obtener clones correspondientes a cualquier región del genoma gracias al proyecto de secuenciación del genoma humano ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

Utilizando la técnica de FISH hemos diseñado un sistema que permite la detección de reordenamientos genéticos del oncogén *BCL6* en células de LNH-B en metafase e interfase celular.

Los reordenamientos del oncogén *BCL6* mediante traslocaciones cromosómicas afectan al 40% de los LDCGB. Hasta ahora, unos veinte genes diferentes han sido descritos en reordenamientos con *BCL6*. El reordenamiento más frecuente de *BCL6* es la t(3;14)(q27;q32). Los puntos de ruptura se dan en la región 'switch' de *IGH* y entre el exón 1 no codificante y el intrón 1 de *BCL6*, en una región denominada MTC ('major translocation cluster'). También es posible encontrar reordenamientos con las cadenas ligeras, *IGK* e *IGL* de las *IGs*, en las traslocaciones t(2;3)(p12;q27) y t(3;22)(q27;q11). La fusión con los 'partners' diferentes de las *IGs* ocurre siempre en la misma

orientación transcripcional que *BCL6*, en la región próxima al promotor del ‘partner’, de forma que el promotor completo del otro gen se sitúa aguas arriba de la región codificante completa de *BCL6*. El promotor de *BCL6* se sitúa en el cromosoma derivativo próximo a la región codificante completa del ‘partner’, presumiblemente regulando su transcripción. El producto de *BCL6* (figura 1 de resultados R1) es un represor transcripcional específico de secuencia (Chang, Ye et al. 1996) que afecta a genes implicados en la diferenciación y activación del linfocito B (Shaffer, Yu et al. 2000) y cuya ausencia impide la formación de folículos en el ratón ‘knock out’ (Ye, Cattoretti et al. 1997). Aunque las vías a través de las cuales ejerce su acción oncogénica no se conocen exactamente, recientes estudios muestran una evolución más agresiva de los tumores que presentan reordenamientos que no afectan a genes de las *IGs* (Ueda, Akasaka et al. 2002). Estos resultados apoyan los argumentos en favor de la necesidad de un método que permita la detección rápida y eficaz de todas y cada una de las traslocaciones de *BCL6* por poseer implicación en el pronóstico de LDCGB.

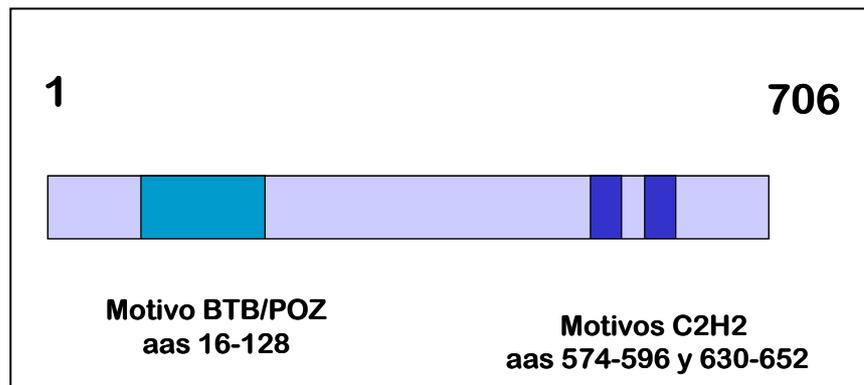


Figura R1: Estructura del producto de *BCL6* con los motivos funcionales y su localización dentro de la secuencia proteica. BTB/POZ: poxvirus y dedo de zinc asociado a interacción proteína-proteína. C2H2: actualmente se denomina SPF1 y es un represor transcripcional que regula el paso G2/M.

Dadas las características del gen, su localización y promiscuidad, las técnicas de citogenética, PCR o inmunohistoquímica son de escasa utilidad para la evaluación de estas alteraciones, de modo que el análisis de las traslocaciones de *BCL6* debe realizarse mediante Southern blotting, una técnica lenta y laboriosa que precisa de grandes

cantidades de ADN tumoral. Por esta razón, la técnica de FISH podría ser la más idónea en la detección de dichos reordenamientos.

Con el fin de establecer un método eficaz y fiable de detección, se testaron diferentes clones en la región correspondiente al *locus BCL6*, seleccionándose tres clones. Uno de ellos cubría el gen *BCL6*, lo que permitió detectar traslocaciones y amplificaciones en dicha región. Los otros dos mapeaban centromérica y teloméricamente al *locus BCL6*, flanqueando la región que comúnmente se trasloca. Para la metodología de las sondas flanqueantes, se realizó un marcaje diferencial de las dos sondas (rojo y verde). Si no existe traslocación, ambas sondas se encuentran fusionadas y si existe traslocación, las sondas se encuentran separadas (figuras 3 y 4 del artículo 1). La utilización de sondas flanqueantes permite distinguir traslocación de trisomía, una alteración también frecuente en LNH-B.

La misma estrategia descrita previamente, pero seleccionando y testando clones diferentes que mapean en regiones específicas de *loci* relacionados con las diferentes patologías, se ha aplicado a la detección de diferentes traslocaciones como *CCND1*, *BCL2* o *MYC* con los genes de las inmunoglobulinas.

La técnica de FISH permite además la cuantificación de la amplificación genómica en células tumorales mediante visualización directa. El desarrollo y la aplicación de esta tecnología ha sido determinante para la consecución de los objetivos científicos de esta Tesis Doctoral.

### **Identificación de una t(14;18)(q32;q21.3) que no afecta a *BCL2* en un paciente con linfoma MALT.**

Artículo 2:

#### **Genomic abnormalities acquired in the blastic transformation of splenic marginal zone B-cell lymphoma.**

Martinez-Climent JA, Sanchez-Izquierdo D, Sarsotti E, Blesa D, Benet I, Climent J, Vizcarra E, Marugan I, Terol MJ, Sole F, Cigudosad JC, Siebert R, Dyer MJ, Garcia-Conde J. *Leuk Lymphoma*. 2003 Mar;44(3):459-64.

Tras el análisis citogenético de una serie de pacientes con linfoma marginal, dos casos presentaron transformación a linfoma de alto grado. Uno de estos dos casos mostró al diagnóstico una traslocación t(14;18)(q32;q21.3), indistinguible a nivel citogenético de la alteración característica del LCF (figura 3 del artículo 2). El análisis con FISH indicó la afectación del gen *IGH* en la banda 14q32, pero no de *BCL2*. Se emplearon sondas para detección de las traslocaciones de *IGH* y para la traslocación entre *IGH* y *BCL2*. En primer lugar, las sondas flanqueando el gen *IGH* aparecían traslocadas. Cuando se utilizaron sondas cubriendo las regiones correspondientes a *BCL2* e *IGH*, la sonda de *BCL2*, que debería aparecer distribuida entre los cromosomas 14 y 18 en caso de que el gen se traslocara, aparecía completamente traslocada al cromosoma 14, lo que estaría indicando un punto de ruptura más centromérico dentro del cromosoma 18. La implicación del gen *BCL2* también fue descartada por PCR, tanto para la traslocación en la región MBR como en la menos frecuente mcr. A continuación, se llevaron a cabo diversas hibridaciones utilizando clones (PACs) que cubrían la región centromérica adyacente a *BCL2* y se determinó que el clon 60F18, que incluía el gen *MALT1*, estaba parcialmente traslocado al cromosoma 14. Estos resultados indicaron la existencia de una traslocación t(14;18)(q32;q21.3) en un paciente con linfoma marginal. Un análisis patológico detallado posterior clasificó dicho caso como un linfoma MALT.

**La nueva traslocación t(14;18)(q32;q21.3) afecta al gen *MALT1* y no a *BCL2* en el linfoma MALT.**

**Artículo 3:**

*MALT1* is deregulated by both chromosomal translocation and amplification in B-cell non-Hodgkin lymphoma.

Sanchez-Izquierdo D, Buchonnet G, Siebert R, Gascoyne RD, Climent J, Karran L, Marin M, Blesa D, Horsman D, Rosenwald A, Staudt LM, Albertson DG, Du MQ, Ye H, Marynen P, Garcia-Conde J, Pinkel D, Dyer MJ, Martinez-Climent JA. *Blood*. 2003 Jun 1;101(11):4539-46

Como consecuencia de la optimización de la técnica de FISH y de los estudios realizados utilizando las diferentes sondas ensayadas en algunos subtipos de LNH-B,

fue posible detectar nuevas alteraciones genéticas en tumores que podrían ser específicos de éstos y participar en su evolución.

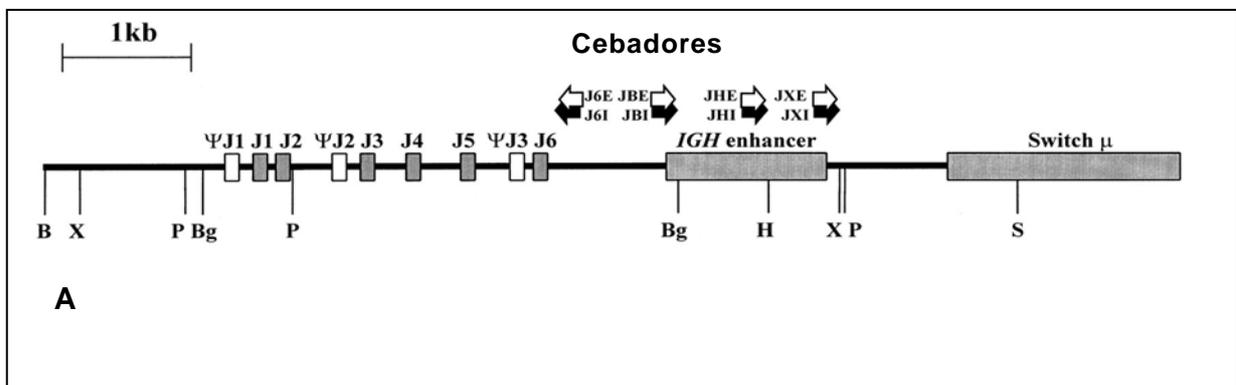
La más novedosa e interesante por estar relacionada con un tipo de tumor poco caracterizado a nivel molecular, fue la traslocación t(14;18)(q32;q21.3) identificada en el caso descrito en el apartado anterior. Además, hallamos un segundo caso correspondiente a un linfoma MALT de la órbita con una traslocación idéntica t(14;18)(q32;q21.3). Ambos casos no presentaron reordenamiento del oncogén *BCL2* mediante estudio con RT-PCR, sugiriéndonos que pudiera tratarse de una traslocación distinta a nivel molecular de la comúnmente observada en el LCF. Además, ambos casos también presentaron una trisomía del cromosoma 3, la cual es frecuente los linfomas marginales pero rara en el LCF. El estudio mediante FISH utilizando sondas para los diferentes genes implicados nuevamente identificó la afectación del gen *IGH* en 14q32, y excluyó la afectación de *BCL2* en 18q21.3. Utilizando el clon 60F18, previamente mapeado y que, como se ha comentado anteriormente, incluía el gen *MALT1*, también se observó que estaba parcialmente traslocado al cromosoma 14. La posibilidad de que *MALT1* estuviera dentro de la región afectada por la traslocación fue confirmada utilizando sondas flanqueantes del gen, que mostraron el patrón de traslocación en ambos casos (figura 2A del artículo 3). Con todo ello, el análisis con FISH determinó un punto de ruptura común para ambos casos en 18q21.3, en el *locus* del gen *MALT1*.

**El clonaje molecular de la nueva traslocación t(14;18)(q32;q21.3) ha permitido identificar el reordenamiento *MALT1-IGH* que produce la disregulación constitutiva de *MALT1*.**

Con el fin de determinar si el gen afectado en la traslocación t(14;18)(q32;q21.3) era *MALT1* y no otro, se utilizó la estrategia de LDI-PCR (de ‘Long Distance Inverse PCR’) a partir de la región Joining del gen *IGH*. Esta técnica consiste en digerir el ADN genómico con enzimas concretas que cortan próximos a la región donde se produce más frecuentemente la traslocación en el gen de las inmunoglobulinas. Los cebadores se sitúan adyacentes al punto de corte pero en sentido inverso. Los fragmentos digeridos son ligados y se realizan dos PCR anidadas de larga distancia sobre los círculos generados (figura 2 de resultados R2). El producto resultante (en caso de que exista una

diana para el enzima de restricción correspondiente de forma que el círculo resultante de la ligación no sea excesivamente grande) contiene una pequeña secuencia de *IGH* y el resto corresponde al gen traslocado. En ambos casos descritos en el anterior apartado se consiguió clonar el punto de ruptura, localizándolo a 1.1 Kb y 1.7 Kb del primer exón no codificante en 5' de *MALT1* (figura 3 del artículo 3). La estructura molecular de la t(14;18)(q32;q21.3) revelada por este análisis es similar a la de otras traslocaciones comunes en los linfomas B que afectan a los oncogenes *MYC*, *BCL2* y *CCND1*, y consiste en la yuxtaposición de la región codificante del gen *MALT1* con el gen *IGH* (figura 3 del artículo 3).

Con el fin de determinar si la traslocación en este punto de ruptura alteraba la expresión del gen, se puso a punto la técnica de RT-PCR cuantitativa para el gen *MALT1*. Se analizó la expresión de *MALT1* en el caso descrito en el primer artículo, por ser el único del cual se disponía de RNA. Los resultados se compararon con la expresión del gen en linfocitos de sangre periférica obtenidos de donantes sanos, así como con diferentes líneas celulares derivadas de pacientes con LNH-B. Los niveles de expresión fueron mayores para el caso con traslocación cromosómica con respecto a los donantes y otras muestras tumorales (figura 4 del artículo 3). En el caso 2 se realizó estudio con inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo monoclonal contra *MALT1* en la biopsia tumoral. Los resultados mostraron sobreexpresión de la proteína en este caso con respecto a otros linfomas que no poseían la traslocación. Estos datos indican que la t(14;18)(q32;q21.3) resulta en la disregulación de *MALT1*.



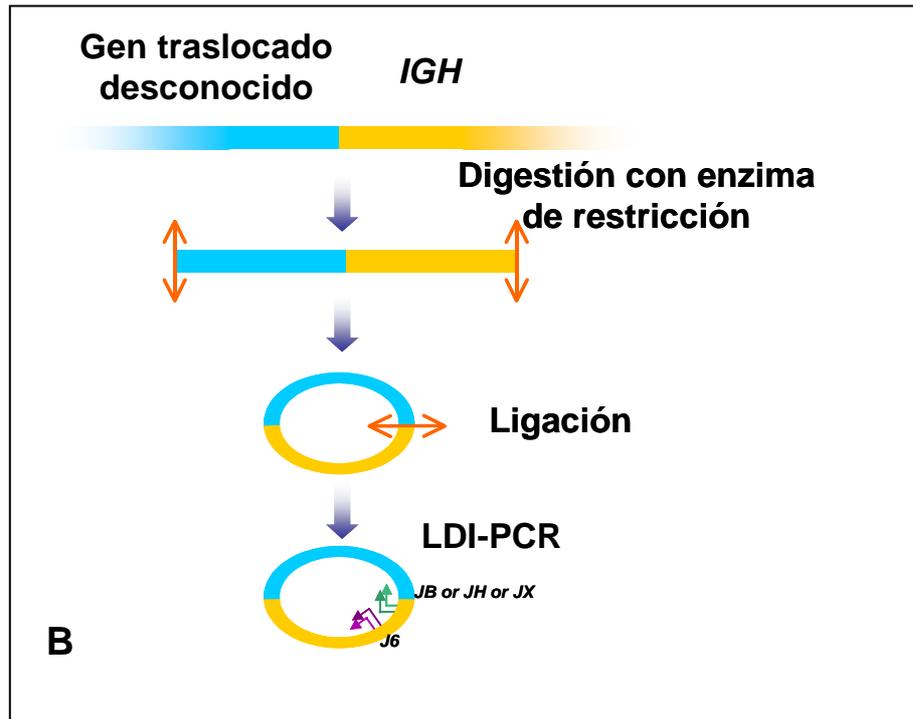


Figura R2: A) Esquema de la región en IGH más frecuentemente traslocada en linfomas (región 'Joining' J6) con el mapa de restricción para los enzimas utilizados y situación de los diferentes cebadores para PCR inversa (flechas).

B) Diagrama del proceso de LDI-PCR. Otra vez, las flechas indican la disposición de los cebadores.

***MALT1* se encuentra amplificado y sobreexpresado en el amplicón de la banda cromosómica 18q21 en linfomas no Hodgkin B.**

La banda cromosómica 18q21 se encuentra frecuentemente amplificada en diferentes tipos de LNH-B. Dichas amplificaciones afectan muy probablemente al oncogén *BCL2*, causando la sobreexpresión de la proteína, lo que produce un efecto patogénico similar a la  $t(14;18)(q32;q21.3)$ . Sin embargo, en ciertos casos no está claro que sea *BCL2* el gen que resulta disregulado a consecuencia de la amplificación, por lo que otros genes en la región podrían verse afectados en este proceso.

Para determinar con mayor exactitud los límites del amplicón en 18q21 y conocer sus implicaciones patológicas, se analizó mediante la técnica de hibridación genómica comparada en BAC microarrays (array CGH) un panel de 40 líneas celulares

derivadas de pacientes con linfomas B. Esta técnica consiste en extraer el ADN genómico de las células tumorales y cohibridarlo con un ADN normal sobre un ‘array’ que contiene sondas (BACs) que cubren la mayor parte del genoma humano con una resolución de 1-2 Mb (Snijders, Nowak et al. 2001). Cada uno de los ADNs es extraído y marcado con un fluoróforo distinto, generalmente verde para el ADN tumoral y rojo para el ADN control o de donante. Las regiones amplificadas en el ADN tumoral generan regiones con aumento de la señal verde sobre el BAC correspondiente a dicha región mientras que las regiones con pérdida de material genético generan zonas de predominio del color rojo debido a la prevalencia del ADN normal. Al realizar el estudio sobre las líneas celulares fue posible detectar zonas de amplificación o delección a lo largo de todo el genoma. Dentro de estas regiones, al ser de pequeño tamaño, es posible reducir el número de genes candidatos a oncogenes o genes supresores tumorales.

Entre las líneas celulares estudiadas, 16 mostraron amplificación de la banda cromosómica 18q21. Los resultados permitieron definir una región de amplificación genómica común correspondiente a 9 Mb entre las bandas 18q21.31 y 18q21.33, y que mostraba dos picos de amplificación: uno situado en el *locus* del gen *MALT1*, mostrando un rango de amplificaciones entre 2,1 y 3 veces y otro más telomérico centrado alrededor del *locus* correspondiente a *BCL2* y amplificado entre 3 y 15 veces (figura 5 del artículo 3). Los resultados obtenidos respecto al número de copias fueron confirmados aplicando la técnica de FISH en las líneas celulares con amplificación y utilizando sondas para *MALT1* y *BCL2* (figura 2B y 2C del artículo 3).

Con el fin de identificar los genes sobreexpresados a consecuencia de la amplificación de 18q21, las líneas celulares fueron analizadas utilizando un ‘microarray’ de expresión llamado ‘lymphochip’. Este es un ‘microarray’ especializado que contiene genes relacionados con la enfermedad y la progresión tumoral relacionada con células B, además de otros genes control y genes relacionados con la apoptosis y el ciclo celular (Alizadeh, Eisen et al. 2000). Se comparó la expresión de 37 cDNAs situados a lo largo del cromosoma 18q en las líneas con amplificación con respecto a las no amplificadas. El clon correspondiente al ARN mensajero de *BCL2* se encontró sobreexpresado en la mayoría de líneas celulares con amplificación del *locus* de *BCL2*, excepto en dos. Estas dos líneas denominadas SSK41 y KHM-10B, fueron establecidas

a partir de células de pacientes con linfoma marginal y linfoma de Burkitt, respectivamente, y mostraron un alto nivel de expresión en la posición del ‘array’ correspondiente a *MALT1*. Con el fin de comprobar los resultados obtenidos para los valores de expresión de *MALT1*, se aplicaron las técnicas de RT-PCR cuantitativa y Western blot, confirmándose la sobre expresión del gen y de la proteína en las dos líneas celulares SSK41 y KHM-10B con respecto al resto. Los valores obtenidos en los ensayos de RT-PCR cuantitativa fueron comparables a aquellos que se obtuvieron en el caso previamente ensayado y portador de la t(14;18)(q32;q21) que no afectaba a *BCL2*.

En resumen, nuestros datos confirman un nuevo mecanismo genético que altera *MALT1* y que consiste en la amplificación genómica. La consecuencia molecular de esta amplificación es la sobre expresión constitutiva de la proteína *MALT1*, de un modo similar a como ocurre en la nueva t(14;18)(q32;q21.3) caracterizada por primera vez en pacientes en este trabajo.

#### **Alteraciones del gen *MALT1* en pacientes con LEZM y linfoma MALT.**

Con el fin de evaluar la presencia de alteraciones del gen *MALT1* en una serie clínica de pacientes, se aplicaron las técnicas de RT-PCR cuantitativa y FISH a 35 casos de LEZM y 5 casos de linfoma MALT. Entre los casos estudiados por FISH, únicamente un caso de MALT gástrico mostró amplificación del gen *MALT1*, además de amplificación de *BCL2*. Esta alteración fue confirmada utilizando la técnica de CGH sobre cromosomas, que detectó amplificación en la banda 18q21. En los estudios mediante RT-PCR cuantitativa, sólo un caso de LEZM mostró sobre expresión de *MALT1*, aunque no fue posible realizar otro tipo de estudios debido a la falta de material.



## **DISCUSIÓN**

Tanto las leucemias como los linfomas son enfermedades monoclonales precedidas por alteraciones en el ADN. Estos cambios son diversos pero pueden agruparse en:

- amplificaciones y traslocaciones cromosómicas que resultan en la sobreexpresión de un oncogén o en la generación de una proteína de fusión con actividad oncogénica,
- mutaciones o deleciones debido a las cuales se produce la inactivación de un gen supresor tumoral.

Las traslocaciones son los cambios más comúnmente hallados en la gran mayoría de los tumores hematopoyéticos así como en algunos tumores sólidos. En un grupo de traslocaciones características de LNH-B la secuencia reguladora normal de un determinado oncogén se sustituye típicamente por un elemento regulador diferente, por ejemplo de los genes reguladores de las IGs, lo que altera la expresión propia del oncogén correspondiente. Otras traslocaciones, más comunes en leucemias, se producen dentro de la región codificante de los genes implicados, lo que tiene como consecuencia la aparición de una proteína de fusión con actividad diferente a la función original. La clonación de puntos de ruptura de las traslocaciones comunes y la identificación de los genes implicados es punto clave para identificar los diferentes oncogenes y entender la función que tienen y como actúan en la progresión tumoral o en la resistencia al tratamiento (Rowley 1999).

En este trabajo se han desarrollado técnicas que detectan reordenamientos en los LNH-B y que, en su consecución, han identificado un nuevo reordenamiento genético característico del linfoma MALT.

## **DESARROLLO DE LA TÉCNICA DE FISH APLICADA AL ANÁLISIS DE LOS LNH-B.**

En el primer artículo de esta memoria se demuestra que la técnica de FISH puede contribuir a la caracterización de nuevos reordenamientos genómicos implicados en la

patogenia de los LNH-B. Aunque el gen *BCL6* se encuentra reordenado en un gran número de LNH-B, la mayor incidencia se da en LDCGB donde aparece reordenado en un 40% de los casos. Uno de los problemas que presenta la detección de estos reordenamientos es el hecho de que *BCL6* se puede encontrar traslocado con diferentes genes. Nuestro trabajo muestra cómo el diseño de sondas flanqueantes de *BCL6* permite detectar todas las posibles traslocaciones del gen. Además, al aplicar dichas sondas al estudio de los diferentes casos, hemos podido detectar nuevos reordenamientos de *BCL6* no descritos previamente.

### **DETECCIÓN DE LA t(14;18)(q32;q21.3) EN UN CASO DE LINFOMA MALT.**

El segundo artículo se refiere a la detección en un caso de linfoma MALT de una traslocación t(14;18)(q32;q21.3) indistinguible a nivel citogenético de la alteración característica del LCF. El análisis con FISH indicó la afectación del gen *IGH* en la banda 14q32, pero no de *BCL2* en la banda correspondiente 18q21. Dado que la PCR es el método más comúnmente utilizado y consolidado para detectar reordenamientos de *BCL2*, se aplicó esta técnica para confirmar que *BCL2* no se encontraba reordenado. Además, los resultados de FISH indicaron un punto de ruptura situado centromérico a *BCL2*. Entre los posibles candidatos en la región traslocada se encontraba el gen *MALT1*, implicado previamente en el linfoma MALT a través de la t(11;18)(q21;q21).

### **ALTERACIONES MOLECULARES CARACTERÍSTICAS DEL LINFOMA MALT Y SU POSIBLE FUNCIÓN EN LA PATOLOGÍA.**

La traslocación más frecuente y característica en el linfoma MALT es la t(11;18)(q21;q21) que fusiona los genes *API2* y *MALT1* (Dierlamm, Baens et al. 1999). El producto de fusión es considerado oncogénico debido principalmente a que el gen *API2* es un gen inhibidor de la apoptosis que pierde su dominio de regulación en la traslocación. Por otra parte, invariablemente el dominio similar a caspasa de *MALT1* se conserva en el producto de fusión mientras que los dominios 'IG-like' pueden o no estar presentes. Ensayos de coimmunoprecipitación demuestran que estos dominios 'IG-like'

son determinantes en la interacción de los productos de *MALT1* y *BCL10* (Lucas, Yonezumi et al. 2001).

*API2* (también conocido como *c-IAP2*, *HIAP1*, *BIRC3* o *MIHC*) pertenece a la familia de inhibidores de apoptosis (*IAP*) que completan los genes *X-IAP*, *API1* (o *C-IAP1*) y *ML-IAP*. Posee tres dominios BIR ('baculovirus IAP repeat'), un dominio de activación de caspasas ('caspase recruitment') y un dominio 'RING finger' (Rothe, Pan et al. 1995; Hofmann, Bucher et al. 1997). La expresión de estos genes en células de mamífero es capaz de inhibir la apoptosis mediada por la eliminación de suero en el medio de cultivo, así como la inducida por menadiona, un potente inductor de radicales libres (Liston, Roy et al. 1996). Este efecto debe estar mediado por la regulación de las señales que median en la activación de proteasas tipo ICE, ya que miembros de esta familia interactúan con las proteínas TRAF1 y TRAF2 ('tumor necrosis factor receptor-associated factors') (Uren, Pakusch et al. 1996). Estudios recientes muestran también que *API2-MALT1* posee capacidad antiapoptótica frente al tratamiento con etopósido o con radiación UV en células HeLa. El producto de fusión interactúa con importantes moléculas implicadas en apoptosis como Smac, HtrA2 o TRAF2 (Hosokawa, Suzuki et al. 2004). Además, dicho producto, es capaz de inducir la activación de NF- $\kappa$ B mediante oligomerización a través de su porción *API2*. Ninguno de los genes completos o formas truncadas de éstos pueden realizar tal función en las líneas celulares ensayadas (Uren, O'Rourke et al. 2000; Lucas, Yonezumi et al. 2001).

*BCL10* es otro gen que ha sido implicado en linfomas MALT debido a que se encuentra traslocado con *IGH* (t(1;14)(p22;q32)) en un reducido número de casos (Willis, Jadayel et al. 1999). *BCL10* codifica una proteína de 233 aminoácidos que contiene un dominio CARD (caspase recruitment domain) característico de las proteínas pro y antiapoptóticas. La traslocación resulta en un incremento de la expresión, principalmente en el núcleo de la célula tumoral. Diferentes estudios en linfocitos T y B relacionan a *BCL10* con los productos de los genes *CARMA1* (*CARD11*) y *MALT1* (Thome and Tschopp 2003; Che, You et al. 2004; Stilo, Liguoro et al. 2004; Thome 2004). Estos tres elementos interactúan entre sí interviniendo en la ruta de activación de NF- $\kappa$ B en algún punto entre la activación del receptor correspondiente (TCR o BCR) y el complejo IKK, que fosforila el inhibidor de NF- $\kappa$ B. El complejo formado parece localizarse en los denominados 'lipid rafts', estructuras que se forman en la

activación de los linfocitos T por parte de las células presentadoras de antígenos. En el ratón 'knock out' para *BCL10* la ausencia de expresión de la proteína impide la formación de células foliculares maduras (Xue, Morris et al. 2003). Las células B de la zona marginal son incapaces de responder a antígeno y el ratón no posee habilidad para iniciar la respuesta humoral. En conclusión, *BCL10* resulta fundamental en el desarrollo y correcta maduración de células B.

### **LA t(14;18)(q32;q21.3) EN LINFOMA MALT IMPLICA AL GEN *MALT1* Y AUMENTA SU EXPRESIÓN.**

La caracterización a nivel molecular del caso con traslocación t(14;18)(q32;q21.3) reveló la presencia de un nuevo *locus* traslocado en la banda 18q21. Otro caso de linfoma MALT de la órbita previamente descrito también mostró la misma traslocación. La presencia del gen *BCL2* en esta región lo mostraba como primer candidato implicado en la traslocación. Al descartar mediante FISH y PCR el reordenamiento de *BCL2* con el gen *IGH*, buscamos posibles candidatos dentro esta la región cromosómica.

Posteriormente a la caracterización citogenética, los estudios de FISH indicaron que el gen *MALT1* se encontraba localizado en la región traslocada. Para confirmar este hecho se utilizó la técnica de LDI-PCR con el fin de clonar la traslocación. En ambos casos se encontró que el gen más próximo a la traslocación era *MALT1* (entre una y dos Kb 5' del primer exón). Uno de ellos presentaba reordenamiento de *IGH*, indicando que la traslocación se había producido después de la recombinación somática de la región J ('joining'). El otro caso presentaba el gen traslocado *IGH* en la configuración germinal. Como ya se ha comentado en la introducción, la configuración germinal corresponde a un estado más inmaduro de la célula B y el inicio del proceso de recombinación somática podría facilitar la producción de recombinaciones no homólogas generando las traslocaciones. El tipo de traslocación encontrado es similar en estructura a otros reordenamientos que afectan a genes previamente caracterizados e implicados en linfomas B como *MYC*, *BCL2*, *BCL10* o *BCL11A*. Los reordenamientos se correlacionan con diferentes estadios de diferenciación según la configuración del gen *IG* que participa en la traslocación (Shaffer, Rosenwald et al. 2002).

Con el fin de confirmar que la nueva situación del gen *MALTI* traslocado actuaba sobre éste y disregulaba su actividad, se utilizó la técnica de RT-PCR cuantitativa, detectando un claro aumento en el número de copias de los ARNm generados. Sólo fue posible aplicar este tipo de prueba en el único caso en el que se disponía de ARN tumoral. También se testaron otras muestras de linfoma MALT que no presentaban la t(14;18)(q32;q21.3) y en ningún caso se obtuvo incremento de expresión, indicando la especificidad de este tipo de alteración.

La caracterización a nivel molecular del caso con traslocación t(14;18)(q32;q21.3) sitúa al gen *MALTI* en una nueva perspectiva, sugiriendo una función de mayor peso dentro de la patología de la que inicialmente se especuló a través del primer reordenamiento descrito con el gen *API2*. Actualmente se conocen algunas de las posibles funciones de *MALTI* y se han asignado los diferentes dominios estructurales: un dominio muerte (DD, 'death domain'), dos dominios tipo inmunoglobulina y un dominio similar a caspasa.

Las caspasas son cisteín-proteasas con gran implicación en apoptosis. El producto del gen *MALTI* es considerado una paracaspasa por este motivo aunque no ha sido posible detectar dicha actividad proteasa en ensayos *in vitro*. Paracaspasas y metacaspasas son dos grupos de genes que codifican para estructuras con una cierta similitud con las caspasas y que se considera comparten un origen común. Se han descrito cuatro paracaspasas pertenecientes a organismos tan dispares como *Dyctiostelium discoideum*, *Danio rerio* o *Caenorhabditis elegans*, además de la humana (Uren, O'Rourke et al. 2000).

De acuerdo con los trabajos previamente descritos, el gen *MALTI* por si mismo no activa *NF-KB*, sino que precisa de la heterodimerización con *BCL10* para activar la ruta. Las mutaciones o defectos en los dominios de interacción reducen drásticamente esta cooperación en la activación (Lucas, Yonezumi et al. 2001). Además, del estudio anatomopatológico del ratón 'knock out' se deduce que *MALTI* es fundamental en la inducción de *NF-KB* mediada por la activación de receptor a través de antígeno tanto en linfocitos B como T así como en la producción de citoquinas y la proliferación. Dichos trabajos sugieren por tanto que *MALTI* debe ser el puente entre el producto de *BCL10* y la activación del complejo IKK que inhibe *NF-KB* (Ruefli-Brasse, French et al. 2003).

Sabemos que la presencia de la traslocación puede inducir cambios en la expresión. Además, los cambios moleculares a nivel de secuencia de ADN podrían iniciar procesos de amplificación a nivel genómico. Nuestro estudio ha permitido correlacionar los cambios en los niveles de expresión, tanto de *MALTI* como de *BCL2*, con el grado de amplificación de la región genómica que contiene ambos *loci* en 18q21. El estudio mediante CGH convencional y CGH ‘array’ en un panel de líneas celulares derivadas de linfomas ha excluido genes relacionados con estos tipos de patologías tales como *FVTI* y *NOXA* y, a su vez, ha permitido destacar como genes afectados en su expresión por las ganancias de material genético a *MALTI* y *BCL2*. Este último presentó patrones anormales en la mayoría de líneas celulares estudiadas. Sin embargo, dos líneas celulares presentaron amplificación de *MALTI* exclusivamente, una de ellas derivada de un paciente con linfoma de la zona marginal y otra derivada de un paciente con linfoma Burkitt. La amplificación génica representa un segundo mecanismo por el cual el gen *MALTI* podría sobreexpresarse. Existen otros ejemplos de genes en LNH-B disregulados por traslocación con los genes de las *IGs* que también pueden aparecer sobreexpresados como consecuencia de amplificaciones genómicas tales como *BCL1*, *BCL2*, *C-MYC* o *BCL11A* (Willis and Dyer 2000; Dyer 2003).

### **ESPECIFICIDAD DE LAS DIFERENTES ALTERACIONES MOLECULARES DENTRO DE LOS LINFOMAS MALT. CORRELACIÓN CON LA LOCALIZACIÓN DE LA ENFERMEDAD Y LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO.**

El linfoma MALT se caracterizó molecularmente y en un principio por la traslocación t(11;18)(q21;q21) y de forma más infrecuente por la t(1;14)(p22;q32). La presencia de la traslocación t(14;18)(q32;q21.3) afectando a *MALTI* descrita en este trabajo ha sido ya corroborada por diferentes autores en otros trabajos aunque en ninguno de ellos se ha clonado la traslocación. Simultáneamente al nuestro se publicó otro artículo incluyendo casos de linfomas con el reordenamiento *MALTI-IGH* detectado exclusivamente por FISH (Streubel, Lamprecht et al. 2003). El primero de ellos relacionó la presencia de esta alteración genética con la localización del linfoma. La traslocación resultó encontrarse excluida de los casos con localización gástrica y

tener una alta frecuencia en los casos de MALT de la órbita, boca, cutáneos primarios, y especialmente en los 4 casos hepáticos estudiados (Streubel, Lamprecht et al. 2003). Desde entonces, estos y otros trabajos confirman que la t(14;18)(q32;q21.3) es una alteración frecuente y específica dentro del linfoma MALT (Murga Penas, Hinz et al. 2003; Remstein, Kurtin et al. 2004; Streubel, Simonitsch-Klupp et al. 2004). Nuestro estudio en una pequeña serie de pacientes con MALT gastrointestinal primario por FISH no encontró ningún caso positivo para la traslocación. Condicionantes como el entorno celular e inmunológico referidos a la localización del tumor deben ser responsables de la aparición de esta alteración molecular ligada a una localización específica.

### **EXPERIENCIAS CON LA LÍNEA CELULAR Ba/F3: CAPACIDAD DE ACTIVACIÓN DE NF-KB Y DE TRANSFORMACIÓN ONCOGÉNICA.**

Dado que los linfocitos B presentan vías específicas de proliferación y muerte celular, se hace patente la necesidad de trasladar los experimentos *ex vivo* a modelos que sean representativos de esta especificidad. De esta manera, las experiencias con el producto de fusión API2-MALT1 en la línea celular HeLa fueron reproducidas en la línea celular murina B denominada Ba/F3 cuya proliferación depende de interleuquina 3 (IL3) (Du, Fang et al. 2000). Los resultados indicaron que las células transfectadas de forma estable con el producto de fusión no mostraron resistencia a la apoptosis inducida por radiación UV o debido a la eliminación de IL3 del medio en el caso de la línea celular B murina. Tampoco fue posible detectar incremento en la expresión de NF-KB en el núcleo, es decir, en su forma activa. Por el contrario, la línea HeLa (adenocarcinoma humano) mostró resistencia a apoptosis. Los autores sugieren que esta resistencia podría estar mediada por la inhibición de Smac, molécula implicada en apoptosis y que las diferencias en los resultados obtenidos pueden ser debidas a que las dos líneas celulares no siempre utilizan las mismas vías apoptóticas (Hosokawa, Suzuki et al. 2004).

En el laboratorio del doctor Martin Dyer (Leicester University & MCR Toxicology Unit) en Reino Unido y tomando el mismo modelo murino, hemos transfectado células Ba/F3 con constructos conteniendo el gen *MALT1*, *BCL10*, ambos

conjuntamente y el elemento de respuesta para activación de *NF-KB*. Después de comprobar en las transfecciones transitorias que la transfección con el gen *MALTI* no influía significativamente en la capacidad proliferativa, así como tampoco *BCL10* o la transfección conjunta, se realizaron ensayos de Western Blot para comprobar que dichas proteínas se expresaban correctamente. Contrariamente a lo esperado, los niveles de proteína *MALTI* disminuyeron a partir de las 12 h después de la transfección, no siendo posible detectar la proteína a las 24 h. Debido a que los plásmidos contienen un promotor de citomegalovirus que no es regulable por la célula, el descenso en los niveles de proteína pueden ser debidos a la activación de un mecanismo de degradación (resultados no publicados).

Un mecanismo conocido en la degradación proteica de genes relacionados con apoptosis es la degradación vía proteosoma. Para comprobar dicho efecto en el caso de *MALTI*, incubamos las células transfectadas con un inhibidor de la función proteosomal (MG132). A parte del efecto parcial de inducción de muerte celular debido al fármaco, no fue posible observar la proteína *MALTI* 24 h después de la transfección. Estos resultados preliminares sugieren otras vías de degradación diferentes de la vía proteosomal.

La proteína *MALTI* posee un tamaño de unos 100 KDa mientras que para *BCL10* es de entre 25 y 37 KDa (diferentes bandas debido a la fosforilación). Se desarrollaron geles de gran tamaño para poder detectar ambas proteínas en el mismo ensayo de Western blot. Se analizaron extractos proteicos 4 h, 8 h y 24 h después de la transfección, observándose la disminución en los niveles de *MALTI* y la aparición de bandas discretas de menor tamaño que podrían ser debidas a una digestión selectiva de la proteína por parte de proteasas específicas (figura 1 de la discusión D1). Para testar esta hipótesis se incubó la proteína *MALTI* con caspasa 3 y caspasa 7 observándose una digestión selectiva en el caso de la caspasa 3. Los ensayos demuestran que el producto de *MALTI* es susceptible de ser degradado por la caspasa 3 *in vitro*, sugiriendo ésta como una posible vía de degradación aunque quizás no la única, a juzgar por el rápido descenso en los niveles de la proteína después de la transfección.

Los ensayos para detectar la activación de *NF-KB* también se realizaron en transfecciones transitorias dentro de las 8 h posteriores a la introducción del plásmido,

cuando aún es posible detectar *MALT1*. Se detectó incremento de la actividad luciferasa correspondiente a la activación de *NF-KB* en el caso de *MALT1* y para la doble transfección *MALT1-BCL10* pero no para *BCL10* solo.

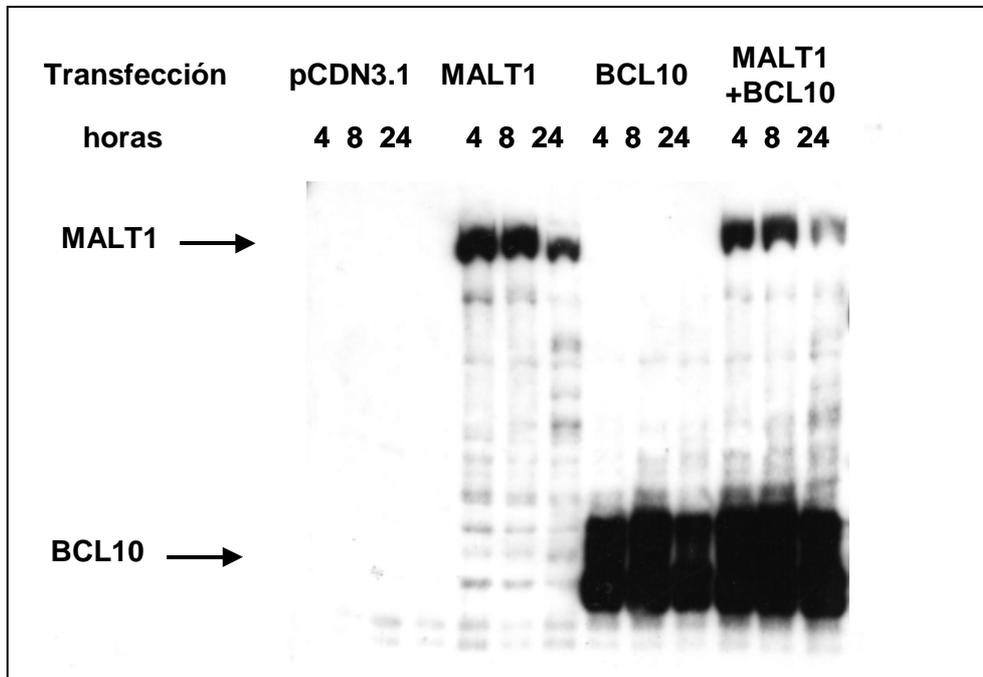


Figura D1: Western blot a partir extractos obtenidos 4, 8 y 24 horas posteriores a la transfección de células Ba/F3 con plásmido vacío, *MALT1*, *BCL10* o ambos y utilizando un anticuerpo anti MYC específicamente diseñado para reconocer un epítipo añadido artificialmente a la proteína clonada en el constructo.

Por otra parte, se seleccionaron clones estables mediante el antibiótico Geneticina cuya resistencia confiere el plásmido y se crecieron en ausencia de IL3. La proliferación o muerte celular fue detectada mediante conteo con tinción ‘Trypan blue’ y citometría de flujo utilizando el test Annexina V-yoduro de propidio para detección de apoptosis. Las células seleccionadas establemente para la expresión de *MALT1* proliferaron en ausencia de IL3 indefinidamente, pero no aquellas transfectadas con plásmido control, con *BCL10* o con *MALT1-BCL10*, sugiriendo que sólo *MALT1* es oncogénico en células de estirpe B. Dicha proliferación se produjo entre 10 y 15 días después de la selección y con una disminución de las poblaciones tal, que no permitió el seguimiento mediante tinción o citometría de flujo debido al reducido número de células. Además, 24 y 48 h después de retirar la IL3 no se detectaron cambios en la apoptosis ni en la proliferación

concluyéndose que sólo una pequeña población celular posee los niveles de expresión adecuados para conferir dicha capacidad de proliferación en ausencia de IL3.

Del conjunto de estudios en la línea celular murina se deduce que *MALTI* se encuentra estrechamente regulado a nivel postraduccional por algún mecanismo endógeno posiblemente específico que incluye digestión proteolítica. Además, *MALTI* posee capacidad de transformación oncogénica en linfocitos B que parece estar ligada a unos niveles de expresión concretos. Este potencial oncogénico podría deberse a la activación del factor *NF-KB*. Dicha activación podría contribuir directamente a la transformación neoplásica en los linfomas MALT.

## CONCLUSIONES

Como resumen de este trabajo, los datos indican que *MALTI* podría actuar como oncogén dominante y específico en la patogenia de algunos LNH-B. Aunque el mecanismo a través del cual actúa es aún desconocido, estudios funcionales podrían determinar su mecanismo de acción y la posibilidad de que pudiera ser utilizado como diana terapéutica en el tratamiento específico de este tipo de tumores.



## *Bibliografía*



- Akiyama, K., N. Kanda, et al. (1994). "Megabase-scale analysis of the origin of N-myc amplicons in human neuroblastomas." Nucleic Acids Res **22**(2): 187-93.
- Alizadeh, A. A., M. B. Eisen, et al. (2000). "Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling." Nature **403**(6769): 503-11.
- Auer, I. A., R. D. Gascoyne, et al. (1997). "t(11;18)(q21;q21) is the most common translocation in MALT lymphomas." Ann Oncol **8**(10): 979-85.
- Bakhshi, A., J. P. Jensen, et al. (1985). "Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18." Cell **41**(3): 899-906.
- Barth, T. F., M. Bentz, et al. (2001). "Molecular-cytogenetic comparison of mucosa-associated marginal zone B-cell lymphoma and large B-cell lymphoma arising in the gastro-intestinal tract." Genes Chromosomes Cancer **31**(4): 316-25.
- Bea, S., M. Ribas, et al. (1999). "Increased number of chromosomal imbalances and high-level DNA amplifications in mantle cell lymphoma are associated with blastoid variants." Blood **93**(12): 4365-74.
- Bentz, M., A. Plesch, et al. (2000). "t(11;14)-positive mantle cell lymphomas exhibit complex karyotypes and share similarities with B-cell chronic lymphocytic leukemia." Genes Chromosomes Cancer **27**(3): 285-94.
- Ben-Yehuda, D., J. Houldsworth, et al. (1994). "Gene amplification in non-Hodgkin's lymphoma." Br J Haematol **86**(4): 792-7.
- Buchonnet, G., F. Jardin, et al. (2002). "Distribution of BCL2 breakpoints in follicular lymphoma and correlation with clinical features: specific subtypes or same disease?" Leukemia **16**(9): 1852-6.
- Cavalli, F., P. G. Isaacson, et al. (2001). "MALT Lymphomas." Hematology (Am Soc Hematol Educ Program): 241-58.
- Chang, C. C., B. H. Ye, et al. (1996). "BCL-6, a POZ/zinc-finger protein, is a sequence-specific transcriptional repressor." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(14): 6947-52.
- Che, T., Y. You, et al. (2004). "MALT1/paracaspase is a signaling component downstream of CARMA1 and mediates T cell receptor-induced NF-kappaB activation." J Biol Chem **279**(16): 15870-6.
- Cleary, M. L., N. Galili, et al. (1986). "Detection of a second t(14;18) breakpoint cluster region in human follicular lymphomas." J Exp Med **164**(1): 315-20.
- Cleary, M. L. and J. Sklar (1985). "Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint-cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(21): 7439-43.
- Dierlamm, J., M. Baens, et al. (1999). "The apoptosis inhibitor gene API2 and a novel 18q gene, MLT, are recurrently rearranged in the t(11;18)(q21;q21)p6-associated with mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas." Blood **93**(11): 3601-9.
- Du, C., M. Fang, et al. (2000). "Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition." Cell **102**(1): 33-42.
- Dyer, M. J. (2003). "The pathogenetic role of oncogenes deregulated by chromosomal translocation in B-cell malignancies." Int J Hematol **77**(4): 315-20.
- Dyomin, V. G., N. Palanisamy, et al. (2000). "MUC1 is activated in a B-cell lymphoma by the t(1;14)(q21;q32) translocation and is rearranged and amplified in B-cell lymphoma subsets." Blood **95**(8): 2666-71.
- Fukuhara, S., J. D. Rowley, et al. (1979). "Chromosome abnormalities in poorly differentiated lymphocytic lymphoma." Cancer Res **39**(8): 3119-28.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- Hofmann, K., P. Bucher, et al. (1997). "The CARD domain: a new apoptotic signalling motif." Trends Biochem Sci **22**(5): 155-6.
- Hosokawa, Y., H. Suzuki, et al. (2004). "Antiapoptotic function of apoptosis inhibitor 2-MALT1 fusion protein involved in t(11;18)(q21;q21) mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma." Cancer Res **64**(10): 3452-7.
- Iaffe E.S., H. N. L., Stein H., Vardiman J.W. (Eds.) (2001). World Health Organization Classification of Tumors: Pathology and Genetics: Tumours of Haemopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France.
- Isaacson PG, M.-H. H., Piris MA, et al. (2001). Extranodal marginal zone B-lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma). World Health Organization Classification of

- Tumors: Pathology and Genetics: Tumours of Haemopoietic and Lymphoid Tissues. I. press. Lyon, France: 121-126.
- Liston, P., N. Roy, et al. (1996). "Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes." Nature **379**(6563): 349-53.
- Liu, H., H. Ye, et al. (2001). "T(11;18)(q21;q21) is associated with advanced mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma that expresses nuclear BCL10." Blood **98**(4): 1182-7.
- Liu, Y. J., D. E. Joshua, et al. (1989). "Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres." Nature **342**(6252): 929-31.
- Liu, Y. J., F. Malisan, et al. (1996). "Within germinal centers, isotype switching of immunoglobulin genes occurs after the onset of somatic mutation." Immunity **4**(3): 241-50.
- Lopez-Guillermo, A., F. Cabanillas, et al. (1999). "Correlation of bcl-2 rearrangement with clinical characteristics and outcome in indolent follicular lymphoma." Blood **93**(9): 3081-7.
- Lovec, H., A. Grzeschiczek, et al. (1994). "Cyclin D1/bcl-1 cooperates with myc genes in the generation of B-cell lymphoma in transgenic mice." Embo J **13**(15): 3487-95.
- Lucas, P. C., M. Yonezumi, et al. (2001). "Bcl10 and MALT1, independent targets of chromosomal translocation in malt lymphoma, cooperate in a novel NF-kappa B signaling pathway." J Biol Chem **276**(22): 19012-9.
- Manohar, C. F., H. R. Salwen, et al. (1995). "Co-amplification and concomitant high levels of expression of a DEAD box gene with MYCN in human neuroblastoma." Genes Chromosomes Cancer **14**(3): 196-203.
- Martinez-Climent, J. A., A. A. Alizadeh, et al. (2003). "Transformation of follicular lymphoma to diffuse large cell lymphoma is associated with a heterogeneous set of DNA copy number and gene expression alterations." Blood **101**(8): 3109-17.
- McDonnell, T. J., N. Deane, et al. (1989). "bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation." Cell **57**(1): 79-88.
- McDonnell, T. J. and S. J. Korsmeyer (1991). "Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14; 18)." Nature **349**(6306): 254-6.
- Monni, O., H. Joensuu, et al. (1997). "BCL2 overexpression associated with chromosomal amplification in diffuse large B-cell lymphoma." Blood **90**(3): 1168-74.
- Montalban, C., A. Manzanal, et al. (1995). "Treatment of low-grade gastric MALT lymphoma with Helicobacter pylori eradication." Lancet **345**(8952): 798-9.
- Morgan, J. A., Y. Yin, et al. (1999). "Breakpoints of the t(11;18)(q21;q21) in mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma lie within or near the previously undescribed gene MALT1 in chromosome 18." Cancer Res **59**(24): 6205-13.
- Morris, S. W., M. N. Kirstein, et al. (1994). "Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma." Science **263**(5151): 1281-4.
- Murga Penas, E. M., K. Hinz, et al. (2003). "Translocations t(11;18)(q21;q21) and t(14;18)(q32;q21) are the main chromosomal abnormalities involving MLT/MALT1 in MALT lymphomas." Leukemia **17**(11): 2225-9.
- Neri, A., F. Barriga, et al. (1988). "Different regions of the immunoglobulin heavy-chain locus are involved in chromosomal translocations in distinct pathogenetic forms of Burkitt lymphoma." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(8): 2748-52.
- Offit, K. and R. S. Chaganti (1991). "Chromosomal aberrations in non-Hodgkin's lymphoma. Biologic and clinical correlations." Hematol Oncol Clin North Am **5**(5): 853-69.
- Ott, G., T. Katzenberger, et al. (1997). "The t(11;18)(q21;q21) chromosome translocation is a frequent and specific aberration in low-grade but not high-grade malignant non-Hodgkin's lymphomas of the mucosa-associated lymphoid tissue (MALT-) type." Cancer Res **57**(18): 3944-8.
- Pandita, A., R. Godbout, et al. (1997). "Relational mapping of MYCN and DDX1 in band 2p24 and analysis of amplicon arrays in double minute chromosomes and homogeneously staining regions by use of free chromatin FISH." Genes Chromosomes Cancer **20**(3): 243-52.
- Pelicci, P. G., D. M. Knowles, 2nd, et al. (1986). "Chromosomal breakpoints and structural alterations of the c-myc locus differ in endemic and sporadic forms of Burkitt lymphoma." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(9): 2984-8.
- Rao, P. H., J. Houldsworth, et al. (1998). "Chromosomal and gene amplification in diffuse large B-cell lymphoma." Blood **92**(1): 234-40.
- Remstein, E. D., P. J. Kurtin, et al. (2004). "Primary pulmonary MALT lymphomas show frequent and heterogeneous cytogenetic abnormalities, including aneuploidy and translocations involving API2 and MALT1 and IGH and MALT1." Leukemia **18**(1): 156-60.
- Rimokh, R., F. Berger, et al. (1994). "Rearrangement of CCND1 (BCL1/PRAD1) 3' untranslated region in mantle-cell lymphomas and t(11q13)-associated leukemias." Blood **83**(12): 3689-96.

- Rimokh, R., M. Gadoux, et al. (1993). "FVT-1, a novel human transcription unit affected by variant translocation t(2;18)(p11;q21) of follicular lymphoma." *Blood* **81**(1): 136-42.
- Rosenwald, A., G. Ott, et al. (1999). "Exclusive detection of the t(11;18)(q21;q21) in extranodal marginal zone B cell lymphomas (MZBL) of MALT type in contrast to other MZBL and extranodal large B cell lymphomas." *Am J Pathol* **155**(6): 1817-21.
- Rothe, M., M. G. Pan, et al. (1995). "The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins." *Cell* **83**(7): 1243-52.
- Rowley, J. D. (1999). "The role of chromosome translocations in leukemogenesis." *Semin Hematol* **36**(4 Suppl 7): 59-72.
- Ruefli-Brasse, A. A., D. M. French, et al. (2003). "Regulation of NF-kappaB-dependent lymphocyte activation and development by paracaspase." *Science* **302**(5650): 1581-4.
- Ruland, J., G. S. Duncan, et al. (2001). "Bcl10 is a positive regulator of antigen receptor-induced activation of NF-kappaB and neural tube closure." *Cell* **104**(1): 33-42.
- Schneider, S. S., J. L. Hiemstra, et al. (1992). "Isolation and structural analysis of a 1.2-megabase N-myc amplicon from a human neuroblastoma." *Mol Cell Biol* **12**(12): 5563-70.
- Schwab, M. and L. C. Amler (1990). "Amplification of cellular oncogenes: a predictor of clinical outcome in human cancer." *Genes Chromosomes Cancer* **1**(3): 181-93.
- Seto, M., U. Jaeger, et al. (1988). "Alternative promoters and exons, somatic mutation and deregulation of the Bcl-2-Ig fusion gene in lymphoma." *Embo J* **7**(1): 123-31.
- Shaffer, A. L., A. Rosenwald, et al. (2002). "Lymphoid malignancies: the dark side of B-cell differentiation." *URL* **2**(12): 920-32.
- Shaffer, A. L., X. Yu, et al. (2000). "BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control." *Immunity* **13**(2): 199-212.
- Snijders, A. M., N. Nowak, et al. (2001). "Assembly of microarrays for genome-wide measurement of DNA copy number." *Nat Genet* **29**(3): 263-4.
- Stilo, R., D. Liguoro, et al. (2004). "Physical and functional interaction of CARMA1 and CARMA3 with Ikappa kinase gamma-NFkappaB essential modulator." *J Biol Chem* **279**(33): 34323-31.
- Streubel, B., A. Lamprecht, et al. (2003). "T(14;18)(q32;q21) involving IGH and MALT1 is a frequent chromosomal aberration in MALT lymphoma." *Blood* **101**(6): 2335-9.
- Streubel, B., I. Simonitsch-Klupp, et al. (2004). "Variable frequencies of MALT lymphoma-associated genetic aberrations in MALT lymphomas of different sites." *Leukemia* **18**(10): 1722-6.
- Summers, K. E., L. K. Goff, et al. (2001). "Frequency of the Bcl-2/IgH rearrangement in normal individuals: implications for the monitoring of disease in patients with follicular lymphoma." *J Clin Oncol* **19**(2): 420-4.
- Thome, M. (2004). "CARMA1, BCL-10 and MALT1 in lymphocyte development and activation." *Nat Rev Immunol* **4**(5): 348-59.
- Thome, M. and J. Tschopp (2003). "TCR-induced NF-kappaB activation: a crucial role for Carma1, Bcl10 and MALT1." *Trends Immunol* **24**(8): 419-24.
- Ueda, C., T. Akasaka, et al. (2002). "Non-immunoglobulin/BCL6 gene fusion in diffuse large B-cell lymphoma: prognostic implications." *Leuk Lymphoma* **43**(7): 1375-81.
- Uren, A. G., K. O'Rourke, et al. (2000). "Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma." *Mol Cell* **6**(4): 961-7.
- Uren, A. G., M. Pakusch, et al. (1996). "Cloning and expression of apoptosis inhibitory protein homologs that function to inhibit apoptosis and/or bind tumor necrosis factor receptor-associated factors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(10): 4974-8.
- Vaux, D. L., S. Cory, et al. (1988). "Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells." *Nature* **335**(6189): 440-2.
- Weber, T., R. G. Weber, et al. (2000). "Characteristic chromosomal imbalances in primary central nervous system lymphomas of the diffuse large B-cell type." *Brain Pathol* **10**(1): 73-84.
- Werner, C. A., H. Dohner, et al. (1997). "High-level DNA amplifications are common genetic aberrations in B-cell neoplasms." *Am J Pathol* **151**(2): 335-42.
- Willis, T. G. and M. J. Dyer (2000). "The role of immunoglobulin translocations in the pathogenesis of B-cell malignancies." *Blood* **96**(3): 808-22.
- Willis, T. G., D. M. Jadayel, et al. (1999). "Bcl10 is involved in t(1;14)(p22;q32) of MALT B cell lymphoma and mutated in multiple tumor types." *Cell* **96**(1): 35-45.
- Wu, G. J., C. S. Sinclair, et al. (2000). "17q23 amplifications in breast cancer involve the PAT1, RAD51C, PS6K, and SIGMA1B genes." *Cancer Res* **60**(19): 5371-5.
- Xue, L., S. W. Morris, et al. (2003). "Defective development and function of Bcl10-deficient follicular, marginal zone and B1 B cells." *Nat Immunol* **4**(9): 857-65.

- Ye, B. H., G. Cattoretti, et al. (1997). "The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2-type inflammation." Nat Genet **16**(2): 161-70.
- Ye, H., A. Dogan, et al. (2000). "BCL10 expression in normal and neoplastic lymphoid tissue. Nuclear localization in MALT lymphoma." Am J Pathol **157**(4): 1147-54.
- Zhang, Q., R. Siebert, et al. (1999). "Inactivating mutations and overexpression of BCL10, a caspase recruitment domain-containing gene, in MALT lymphoma with t(1;14)(p22;q32)." Nat Genet **22**(1): 63-8.
- Zucca, E., F. Bertoni, et al. (2003). "Pathogenesis and treatment of extranodal lymphomas: the fascinating model of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma." Haematologica **88**(8): 841-4.



## *Notas*