

ACTA DE EVALUACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL

Año académico 2016/17

DOCTORANDO: GARCÍA VERDES-MONTENEGRO, JOSÉ FRANCISCO

PROGRAMA DE DOCTORADO: D425-SEÑALIZACIÓN CELULAR

DEPARTAMENTO DE: BIOLOGÍA DE SISTEMAS

TITULACIÓN DE DOCTOR EN: DOCTOR/A POR LA UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

En el día de hoy 11/07/17, reunido el tribunal de evaluación nombrado por la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado de la Universidad y constituido por los miembros que suscriben la presente Acta, el aspirante defendió su Tesis Doctoral, elaborada bajo la dirección de MIGUEL ANGEL PIRIS PINILLA // GIOVANNA RONCATOR.

Sobre el siguiente tema: *DEL ANTICUERPO AL DIAGNÓSTICO: MALT1, BCL6 Y PRDM1/BLIMP1 COMO MARCADORES DE NEOPLASIAS LINFOIDES HUMANAS*

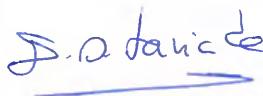
Finalizada la defensa y discusión de la tesis, el tribunal acordó otorgar la CALIFICACIÓN GLOBAL³ de (no apto, aprobado, notable y sobresaliente): SOBRESALIENTE

Alcalá de Henares, 11 de Julio de 2017

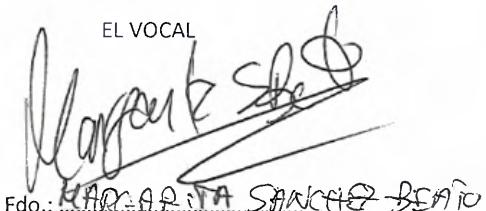


Fdo.: FEDERICO ROJO

EL SECRETARIO



Fdo.: INÉS DIAZ-LAVADA



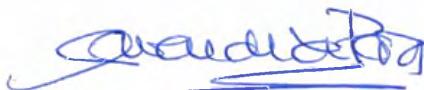
Fdo.: MARÍA JOSÉ SÁNCHEZ BENÍTEZ

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ, PATRIMONIO DE LA HUMANIDAD

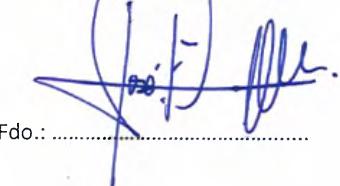
Con fecha 24 de julio de 2017 la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado, a la vista de los votos emitidos de manera anónima por el tribunal que ha juzgado la tesis, resuelve:

- Conceder la Mención de "Cum Laude"
 No conceder la Mención de "Cum Laude"

La Secretaria de la Comisión Delegada



FIRMA DEL ALUMNO,



Fdo.:

³ La calificación podrá ser "no apto" "aprobado" "notable" y "sobresaliente". El tribunal podrá otorgar la mención de "cum laude" si la calificación global es de sobresaliente y se emite en tal sentido el voto secreto positivo por unanimidad.

INCIDENCIAS / OBSERVACIONES:

Ha actuado el vocal suplente Dra Margarita Sánchez - Boato



COMISIÓN DE ESTUDIOS OFICIALES
DE POSGRADO Y DOCTORADO

En aplicación del art. 14.7 del RD. 99/2011 y el art. 14 del Reglamento de Elaboración, Autorización y Defensa de la Tesis Doctoral, la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado, en sesión pública de fecha 24 de julio, procedió al escrutinio de los votos emitidos por los miembros del tribunal de la tesis defendida por **GARCÍA VERDES-MONTENEGRO, JOSÉ FRANCISCO**, el día 11 de julio de 2017, titulada *DEL ANTICUERPO AL DIAGNÓSTICO: MALT1, BCL6 Y PRDM1/BLIMP1 COMO MARCADORES DE NEOPLASIAS LINFOIDES HUMANAS*, para determinar, si a la misma, se le concede la mención "cum laude", arrojando como resultado el voto favorable de todos los miembros del tribunal.

Por lo tanto, la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado resuelve otorgar a dicha tesis la

MENCIÓN "CUM LAUDE"

Alcalá de Henares, 27 julio de 2017
EL PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE ESTUDIOS
OFICIALES DE POSGRADO Y DOCTORADO



Firmado digitalmente por VELASCO
PEREZ JUAN RAMON - DNI
03087239H
Fecha: 2017.07.28 11:16:10 -06'00'

Juan Ramón Velasco Pérez

Copia por e-mail a:

Doctorando: GARCÍA VERDES-MONTENEGRO, JOSÉ FRANCISCO

Secretario del Tribunal: INÉS DÍAZ LAVIADA.

Directores de Tesis: MIGUEL ANGEL PIRIS PINILLA // GIOVANNA RONCADOR



**Universidad
de Alcalá**
ESCUELA DE DOCTORADO
Servicio de Estudios Oficiales de
Posgrado

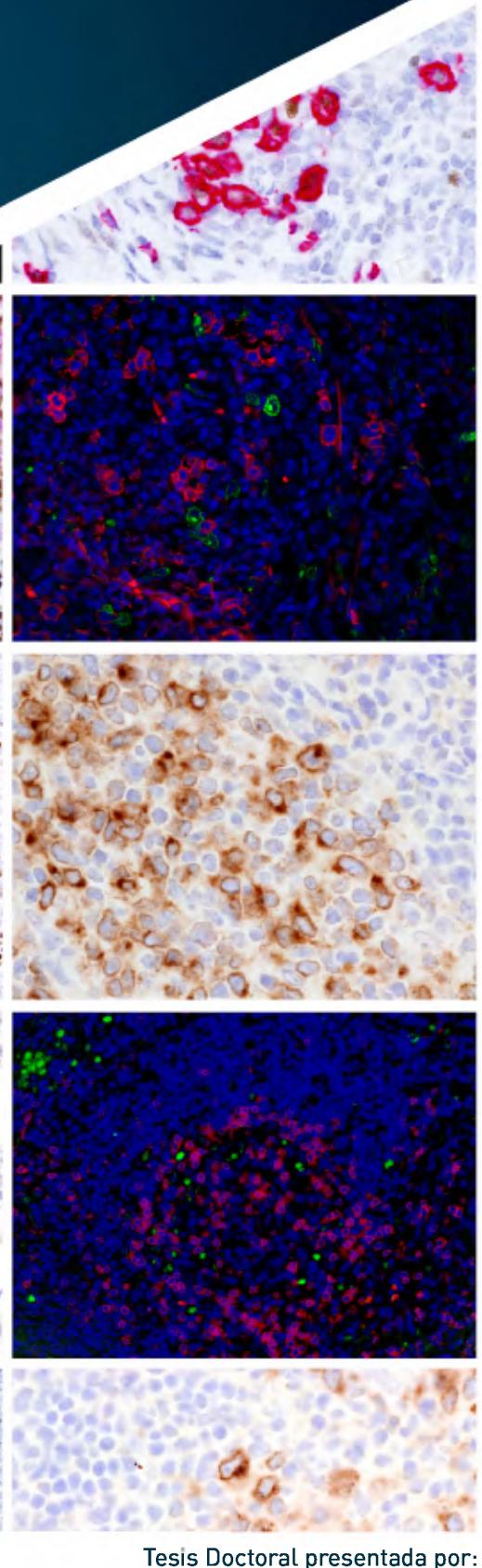
DILIGENCIA DE DEPÓSITO DE TESIS.

Comprobado que el expediente académico de D./D^a _____
reúne los requisitos exigidos para la presentación de la Tesis, de acuerdo a la normativa vigente, y habiendo
presentado la misma en formato: soporte electrónico impreso en papel, para el depósito de la
misma, en el Servicio de Estudios Oficiales de Posgrado, con el nº de páginas: _____ se procede, con
fecha de hoy a registrar el depósito de la tesis.

Alcalá de Henares a _____ de _____ de 20_____

Fdo. El Funcionario

**Del anticuerpo al diagnóstico:
MALT1, BCL6 y PRDM1/BLIMP1
como marcadores de neoplasias
linfoides humanas**



Tesis Doctoral presentada por:
JOSÉ FRANCISCO GARCÍA VERDES-MONTENEGRO

2017



**Departamento de Biología de Sistemas de la
Universidad de Alcalá,**

**Del anticuerpo al diagnóstico:
MALT1, BCL6 y PRDM1/BLIMP1 como
marcadores de neoplasias linfoides humanas**

Tesis Doctoral presentada por:
JOSÉ FRANCISCO GARCÍA VERDES-MONTENEGRO

**Director: Dr. MIGUEL ÁNGEL PIRIS PINILLA
Co-directora: Dra. GIOVANNA RONCADOR**

Alcalá de Henares, 2017



Dr. Miguel Ángel Piris, Médico Jefe Asociado, Servicio de Anatomía Patológica, Fundación Jiménez Díaz, Madrid.

Dra. Giovanna Roncador, Responsable de la Unidad de Anticuerpos Monoclonales del Programa de Biotecnología del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas de Madrid.

CERTIFICAN:

Que don **José Francisco García Verdes-Montenegro** ha realizado el presente trabajo: “*Del anticuerpo al diagnóstico: MALT1, BCL6 y PRDM1/BLIMP1 como marcadores de neoplasias linfoides humanas*” y que a su juicio reúne plenamente todos los requisitos necesarios para optar al **Grado de Doctor**, a cuyo efecto será presentado en la Universidad de Alcalá. El trabajo se ha realizado bajo nuestra co-dirección, autorizando su presentación ante el tribunal correspondiente.

Y para que conste se extiende el presente certificado

Madrid a 10 de Abril de 2017

VºBº de los directores de la Tesis

Dra. Giovanna Roncador

Dr. Miguel Ángel Piris

Antonio Jiménez Ruiz, Director del Departamento de Biología de Sistemas de la Universidad de Alcalá,

INFORMA:

Que el trabajo titulado "*Del anticuerpo al diagnóstico: MALT1, BCL6 y PRDM1/BLIMP1 como marcadores de neoplasias linfoides humanas*" ha sido realizado por **José Francisco García Verdes-Montenegro** en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas bajo la dirección de la Dra. Giovanna Roncador y Dr. Miguel Ángel Piris Pinilla, siendo la Dra. Inés Díaz-Laviada Marturet tutora del Departamento de Biología de Sistemas de la Universidad de Alcalá y, a su juicio, cumple todos los requisitos necesarios para que el interesado opte al Grado de Doctor.



Alcalá de Henares, 21 de Marzo de 2017

*Dedico esta tesis al hombre que más admiro:
un amigo cuyo recuerdo me conforta,
un guía cuya sabiduría siempre me dirige,
una persona cuyo ejemplo constantemente me ilustra,
una fuerza que ahora vive en mí...*

Mi padre,

José María García Patallo

*A Elena, Rodrigo y
María. Mi vida.*

*A mi madre y a mi
hermano Enrique.
Siempre a mi lado.*

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

En estas páginas quisiera expresar mi agradecimiento a todas las personas que, de una u otra manera, han contribuido a la conclusión de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar, quiero agradecer a la Dra. Giovanna Roncador, codirectora de esta Tesis Doctoral, por haberme abierto las puertas de la investigación y de los anticuerpos monoclonales. Gracias a tus enseñanzas he crecido como persona y desarrollado mi actividad profesional. Siempre te estaré agradecido.

A Miguel Ángel Piris, por su dirección y entusiasmo en el estudio de los linfomas. Por no perder nunca el sentido del humor.

A Inés Díaz-Laviada, tutora de esta Tesis Doctoral. Cuando sientas que todo es muy complicado, que compaginar docencia e investigación es demasiado sacrificio, recuerda: para muchos de nosotros, tú eres la llama que lo inicia todo.

Al Profesor David Mason y a la Dra. Teresa Marafioti, por darme la oportunidad de trabajar en una de las unidades más importantes de producción de Anticuerpos Monoclonales de Europa (Leukaemia Research Fund Immunodiagnostics Unit, Oxford, Reino Unido). A todos sus miembros, pero en especial a Margaret Jones, Jacqueline L. Cordell, Sara Teldoldi y Jennifer C. Paterson.

A Elena, mi mujer. Por estar a mi lado y hacerme sentir el hombre más afortunado del mundo. Gracias por acompañarme estos años y darme una familia. Por Rodrigo y por María. Los tres sois mí fuerza en la vida. Esta tesis es en gran parte vuestra.

A mi padre, a mi madre y a Quique. Por vuestro amor incondicional. Nunca podré agradecerlos todo lo que me dais. Siempre, pase lo que pase, estaremos juntos. Sin vosotros ni esta tesis ni otras muchas cosas serían posibles.

A todos los que han contribuido a esta tesis en el CNIO. A Lorena, Elenita, las niñas, Dolly, Conchi, Slavina, Raquel, Lydia, Ana, Marta, Sergio, Cris, Nerea, Lorraine, Esther, Fátima, Alicia, Rocío, Juanfe, Cristina, Lidia, Silvia, Paula y tantos otros. A mis amigos y amigas del animalario, en especial a Aurora y Sergio, cuánto hemos pasado, cuantas risas, cuantas vivencias. A los compañeros de las unidades de Linfomas, Inmunohistoquímica, Citogenética, Microscopía Confocal, Proteínas y Banco de Tumores. Gracias a todos. Siempre hubo tiempo de ayudar, de compartir, de vivir.

A mis amigos y familiares, en especial a aquellos que han vivido esta tesis más de cerca: Michel, Mario, Bea, Moisés, Sandra, Menchu, Raquel, David, Juan, Mini, Roberto, Javi, Teresa, Romain, José Luis, Rosa María, Esmeralda y Jorge. A mis sobrinos pequeños Marcos y a Lara.

Finalmente, agradezco al Ministerio de Ciencia y Tecnología y a la Comunidad Autónoma de Madrid la financiación obtenida para la realización de esta Tesis Doctoral.

RESUMEN

RESUMEN

En la actualidad, existe una necesidad creciente de identificar nuevos marcadores útiles para la comprensión de la biología de las neoplasias linfoides y que puedan tener un valor pronóstico y clínico en los pacientes. Los anticuerpos monoclonales se han convertido en las últimas décadas en una poderosa herramienta para la identificación de marcadores específicos en muestras de tejido. Representan un valioso instrumento para la investigación, el diagnóstico y el pronóstico de las neoplasias linfoides y están facilitando el progreso hacia una medicina personalizada de precisión.

En la presente Tesis Doctoral, se describe la producción, validación y caracterización de anticuerpos monoclonales frente a las proteínas BCL6, MALT1 y PRDM1/BLIMP1 para facilitar el estudio del papel que juegan estas proteínas clave en el desarrollo de los linfocitos reactivos y de las neoplasias linfoides humanas. Para su producción, además de metodologías de inmunización convencionales, se desarrolló un método alternativo, la inmunización genética; esta técnica de inmunización facilitó la producción de los anticuerpos monoclonales específicos frente a las proteínas BCL6 y MALT1.

Comparando los anticuerpos frente la proteína BCL6 generados mediante inmunización convencional (clones ST42B/H7 y PG-B6p) e inmunización genética (clon GI191E/A8), el clon GI191E/A8 presentó una mayor sensibilidad para detectar la expresión de la proteína, de manera más independiente de la fijación que los otros clones. Estas cualidades convierten al nuevo anticuerpo monoclonal GI191E/A8 en una herramienta de gran valor en el diagnóstico de las neoplasias linfoides.

Por su parte, el anticuerpo monoclonal producido frente a la proteína MALT1, clon RON169, permite detectar de forma específica la proteína mediante WB e inmunoprecipitación. Esta habilidad ofrece múltiples aplicaciones en la investigación de las neoplasias linfoides.

Finalmente, mediante la utilización del anticuerpo generado frente a la proteína PRDM1/BLIMP1, clon ROS, se ha descrito y documentado por primera vez la expresión de esta proteína a nivel celular en tejido normal y en neoplasias linfoides humanas. Se demuestra con ello su utilidad como marcador de la diferenciación terminal de los linfocitos B y de las células plasmáticas. PRDM1/BLIMP1 se expresa en la mayoría de los linfomas caracterizados por una diferenciación plasmacítica (mielomas, plasmacitomas, linfomas linfoplasmacíticos, linfomas plasmablasticos de tipo de mucosa oral y linfomas difusos de células B grandes [LDCBG] con

morfología inmunoblastica). También se detectó su expresión en el 43% de los LDCBG, 41% de los linfomas de Hodgkin, 23% de los linfomas T y en un subgrupo de leucemias linfocíticas crónicas (15%). Por último, destacar que la expresión de PRDM1/BLIMP1 se correlacionó con una menor supervivencia libre de fallo en LDCBG, por lo que tiene además un interés como marcador pronóstico.

Por todo lo expuesto, se concluye que estos nuevos anticuerpos monoclonales específicos frente a las proteínas MALT1, BCL6 y PRDM1/BLIMP1 representan herramientas de gran interés como marcadores de neoplasias linfoides humanas. Sus cualidades les permiten ser útiles para la investigación y el diagnóstico y pronóstico de dichas enfermedades. Fruto de este interés, los tres anticuerpos monoclonales han sido licenciados en algunas de las más prestigiosas compañías internacionales que comercializan este tipo de herramientas (Anexo 1).

ESTRUCTURA DE LA TESIS DOCTORAL

ESTRUCTURA DE LA TESIS DOCTORAL

La presente Tesis Doctoral está estructurada siguiendo la normativa de la Universidad de Alcalá para tesis doctorales. Está redactada como un compendio de tres artículos del doctorando en publicaciones de reconocido prestigio. Comienza con una Introducción que busca dar coherencia al conjunto de la investigación y facilitar la comprensión de los artículos incluidos. La Introducción termina con la sección de Hipótesis y Objetivos para esta Tesis Doctoral.

A continuación se incluye una sección de Materiales y Métodos, de gran interés al tratarse de una Tesis Doctoral con un importante componente metodológico. En la sección de Resultados se presentan los tres trabajos publicados por el doctorando tal y como aparecen en las publicaciones originales:

Título	Revista	Año
<i>Genetic immunization: a new monoclonal antibody for the detection of BCL-6 protein in paraffin sections</i>	<i>Journal of Histochemistry and Cytochemistry</i>	2006
<i>Generation of a new monoclonal antibody against MALT1 by genetic immunization</i>	<i>Hybridoma</i>	2007
<i>PRDM1/BLIMP-1 expression in multiple B and T-cell lymphoma</i>	<i>Haematologica/The Hematology Journal</i>	2006

Tras los artículos científicos se incluyen la Discusión, las principales Conclusiones que se derivan de los trabajos publicados y la Bibliografía utilizada.

Por último, en la sección de Anexos se incluyen las actividades de comercialización (Anexo 1) y de participación en publicaciones científicas y congresos (Anexo 2) que son resultado de la presente Tesis Doctoral.

*"It is more important to know
what sort of person has a disease than
what sort of disease a person has"*

Hippocrates

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
INTRODUCCIÓN.....	5
NEOPLASIAS LINFOIDES: INCIDENCIA Y EPIDEMIOLOGÍA.....	8
CLASIFICACIÓN ACTUAL DE LOS LINFOMAS.....	10
BASES CITOEVOLUTIVAS Y FUNCIONALES DE LOS LINFOMAS.....	13
Desarrollo, maduración y diferenciación normal de los linfocitos B: el centro germinal.....	14
Mecanismos de generación de neoplasias linfoides.....	17
Aplicaciones del marcaje inmunofenotípico en el estudio de los linfomas	19
DESARROLLO DE NUEVOS MARCADORES DE TEJIDO LINFOIDE HUMANO:	
BCL6, MALT1 y PRDM1/BLIMP1	22
El represor transcripcional BCL6 y su relación con las neoplasias linfoides	22
MALT1, paracaspasa esencial en la activación del sistema inmune mediante el factor de transcripción NF-κB.	24
Factores de transcripción responsables de la diferenciación plasmática: PRDM1/BLIMP1	29
ANTICUERPOS MONOCLONALES, INMUNOFENOTIPO E IMPLICACIONES EN EL ESTUDIO DE LINFOMAS	33
Técnicas de producción de anticuerpos monoclonales: inmunización genética aplicada a la producción de nuevos marcadores linfoides	34
Aplicación de los nuevos anticuerpos en el estudio de los linfomas humanos: inmunohistoquímica e inmunofluorescencia, líneas celulares derivadas de linfomas humanos y tissue-microarrays	47
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	49
MATERIALES Y MÉTODOS.....	51
LÍNEAS CELULARES	52
RATONES BALB/c.....	53
MUESTRAS DE TEJIDO Y MATRICES DE TEJIDOS	53
Biopsias completas	54
Preparación de matrices de tejidos.....	54
Análisis de la expresión de proteínas en matrices de tejidos	55

PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.....	56
Métodos de inmunización convencionales	56
Inmunización y producción de anticuerpos monoclonales anti-MALT1 y anti-BCL6 por inmunización genética vía <i>Gene-Gun</i>	57
Cultivo y selección de los hibridomas de interés.....	59
ANTICUERPOS.....	60
PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.....	61
ENSAJOS DE AFINIDAD DE ANTICUERPOS PRIMARIOS.....	62
ELECTROFORESIS EN GEL DE ACRILAMIDA EN PRESENCIA DE DODECIL SULFATO SÓDICO (SDS-PAGE) Y WESTERN BLOTTING (WB)	62
INMUNOPRECIPITACIÓN	64
TÉCNICAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA Y DE INMUNOFLUORESCENCIA	65
Inmunohistoquímica en tejido congelado y en preparaciones de citocentrífuga.....	65
Inmunohistoquímica convencional en tejido incluido en parafina.....	66
Doble tinción inmunohistoquímica.....	68
Inmunofluorescencia indirecta simple o doble combinada con inmunohistoquímica.....	68
SERIES CLÍNICAS	69
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	70
RESULTADOS EN PUBLICACIONES ORIGINALES	71
ARTÍCULOS ORIGINALES.....	72
DISCUSIÓN.....	98
LA INMUNIZACIÓN GENÉTICA APLICADA A LA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES PARA LA DETECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS BCL6 Y MALT1.....	99
ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE PRDM1/BLIMP1 EN MÚLTIPLES LINFOMAS DERIVADOS DE CÉLULAS B Y T/NK	107
ANTICUERPOS MONOCLONALES PARA LA DETECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS MALT1, BCL6 y PRDM1/BLIMP1	112
CONCLUSIONES.....	113
BIBLIOGRAFÍA	115

ANEXOS	124
ANEXO 1. COMERCIALIZACIÓN DE LOS ANTICUERPOS	125
Anticuerpo anti- BCL6.....	126
Anticuerpo anti- MALT1.....	142
Anticuerpo anti- PRDM1/BLIMP1	145
ANEXO 2. PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS Y PUBLICACIONES CIENTÍFICAS RELACIONADAS	153
Participación en publicaciones científicas relacionadas	153
Participación en congresos internacionales relacionados	154

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

A20: *Tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 (TNFAIP3)*

ABC: *Activated B-cell*

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico codificante

ALK: *Anaplastic lymphoma kinase*

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ASR: Tasa estandarizada por edad, por sus siglas en inglés

ASR(W): ASR respecto a la población mundial, por sus siglas en inglés

ATCC: *American Type Culture Collection*

BCL: *B-Cell CLL/Lymphoma*

BCR: *B-cell receptor*

BOB1: *B-lymphocyte-specific co-activator*

BTZ/POZ: *Broad-Complex, Tramtrack and Bric a brac*

CD: *Cluster of differentiation*

CG: Centro germinal

CHOP: Ciclofosfamida, hidroxi doxorubicina, vincristina y prednisona

CIITA: Transactivador del complejo mayor de histocompatibilidad clase II

CMV: Citomegalovirus

CNIO: Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas

CXCR5: *C-X-C chemokine receptor type 5*

DAB: Diaminobencidina

DAPI: 4 ',6-diamino-2-fenilindol

DMSO: Dimetilsulfóxido

EBER: *Epstein-Barr virus (EBV)-encoded small RNA*

EBV: Virus de Epstein-Barr, por sus siglas en inglés

ECL: *Enhanced chemiluminescence*

EDTA: *Ethylenediaminetetraacetic acid*

EMA-1: *Equi Merozoite Antigen 1*

EN: Esclerosis nodular

FOXP-1: *Forkhead box protein P1*

GCB: *Germinal Center B-Cell like*

GCET1: *Germinal center B-cell expressed transcript 1*

GG: *Gene-Gun*

- GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos, por sus siglas en inglés
- GST: *Glutathione S-transferase*
- HAT: *Hypoxanthine-aminopterin-thymidine*
- HEK: *Human Embryo Kidney*
- HGPRT: Hipoxantina-guaninafosforibosiltransferasa, por sus siglas en inglés
- HRP: *Horseradish peroxidase*
- H-RS: Hodgkin-Reed-Sternberg
- IAP: *Inhibitor-of-apoptosis*
- IARC: *International Agency for Research on Cancer*
- Ig: Inmunoglobulinas
- IHQ: Inmunohistoquímica
- IKK: *IκB kinase*
- IκB: Inhibidor de NF-κB
- ILSG: *International Lymphoma Study Group*
- IP: Inmunoprecipitación
- IPI: Índice de Pronóstico Internacional
- ITAM: *Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*
- KLF-2: *Krüppel-like Factor 2*
- LDCBG: Linfoma difuso de células B grandes
- LF: Linfoma folicular
- LH: Linfoma Hodgkin
- LHNPL: LH nodular de predominio linfocítico
- LIMA1: *LIM domain and actin-binding protein 1*
- LLC: Leucemia linfocítica crónica
- LMA: Leucemia mieloide aguda
- LMO2: *LIM domain only 2*
- LNH: Linfoma No Hodgkin
- LP: Linfocitos predominantes
- MALT: Linfoma del tejido linfoide asociado a mucosas
- MHCII: Complejo mayor de histocompatibilidad clase II
- MM: Mieloma múltiple
- MO: Médula ósea
- MUM1/IRF4: *Multiple Myeloma Oncogene 1/ Interferon Regulatory Factor 4*
- MYC: *V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog*
- NF-κB: *Nuclear factor κB*
- NIK: *NF-κB -inducing kinase*

NK: *Natural killer*

NOS: No especificado, por sus siglas en inglés

OMS: Organización Mundial de la Salud

OCT: *Octamer binding protein*

P63: *Intracellular type II transmembrane protein (rough endoplasmic reticulum)*

PAGE: *Polyacrylamide gel electrophoresis*

PAX5/BSAP: *B-cell specific activator protein*

PBS: *Phosphate buffered saline*

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés

PEG: Polietilglicol

PRDM1/BLIMP1: *Positive regulatory domain I protein 1/ B lymphocyte-induced maturation protein-1*

RGB: *Red, Green, Blue*

r.p.m.: Revoluciones por minuto

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*

SAP: *Serum Amyloid P*

SDS: Duocecil sulfato sódico, por sus siglas en inglés

SG: Supervivencia global

SLE: Supervivencia libre de enfermedad

SLL: Linfoma de linfocitos pequeños, por sus siglas en inglés

SP: Sangre periférica

TCR: *T-cell receptor*

TDFR: *Tumor Differentiation Factor Receptor*

TdT: Transferasa deoxynucleotidil terminal

TIA: *Cytotoxic Granule Associated RNA Binding Protein*

TMA: *Tissue-Microarray*

TNF: Factor de necrosis tumoral, por sus siglas en inglés

TNFAIP3: *TNF Alpha Induced Protein 3*

VHC: Virus de la hepatitis C

VHH: Virus herpes humano

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

VLCH: Virus linfotrópico de células T Humanas

W: Vatio

WB: *Western blotting*

XBP1: *X-box binding protein 1*

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Las neoplasias linfoides son un grupo de alteraciones malignas que se originan en el sistema linfoide por la proliferación descontrolada de los linfocitos. Numerosos estudios clínicos y genéticos realizados en linfomas han contribuido a establecer la existencia de diversos tipos de enfermedades linfoproliferativas, cada una de ellas provista de personalidad clinicopatológica propia y en las que se han identificado alteraciones genéticas múltiples, sucesivas y específicas de cada tipo de neoplasia.

Los anticuerpos monoclonales se empezaron a utilizar como marcadores del tejido linfoide hace más de 20 años para facilitar el diagnóstico patológico y clasificar las diferentes alteraciones linfoproliferativas. Desde entonces, su aplicación ha permitido un cambio radical en la concepción y en el manejo de esta patología, lo que ha supuesto desde el reconocimiento de nuevas entidades hasta el nacimiento de nuevas clasificaciones.

De forma general, los anticuerpos utilizados como marcadores inmunofenotípicos permiten un mayor conocimiento de la biología tumoral, facilitan el diagnóstico rutinario y mejoran la clasificación de los tumores malignos. Al mismo tiempo, permiten la identificación de patrones de expresión proteica asociados a un comportamiento clínico, por lo que adquieren un valor pronóstico. Adicionalmente, los anticuerpos monoclonales se utilizan en la actualidad como marcadores inmunofenotípicos predictivos de respuesta a un tratamiento. Un ejemplo característico son los anticuerpos utilizados para la determinación por inmunohistoquímica (IHQ) de receptores hormonales en cáncer de mama (receptores de estrógenos y progesterona) y su relación con la hormonoterapia.

Durante los últimos años se han desarrollado múltiples marcadores que detectan dianas para el desarrollo de terapias dirigidas. Ese hecho ha provocado que, hoy en día, los anticuerpos monoclonales constituyan además un eslabón optimista para el tratamiento del cáncer. Uno de los ejemplos más exitosos está relacionado con la proteína *human epidermal growth factor receptor 2* (HER2), implicada en cáncer de mama. El desarrollo de anticuerpos monoclonales frente a esta proteína ha permitido reconocer una entidad neoplásica propia, el cáncer de mama HER2 positivo (HER2 +). Los anticuerpos frente a HER2 han permitido además convertir esta proteína en un biomarcador inmunofenotípico con interés pronóstico y valor predictivo de respuesta (1). La determinación de HER2 con estos anticuerpos permite seleccionar aquellos pacientes con cáncer de mama HER2+ y con mayor probabilidad de responder a tratamientos dirigidos frente a esta proteína. Algunos de estos tratamientos dirigidos son igualmente anticuerpos monoclonales humanizados, como trastuzumab, pertuzumab o T-DM1, que

consiguen aumentar la supervivencia de las pacientes, el tiempo libre de síntomas/progresión y mejoran su calidad de vida (2). Los resultados de dichos tratamientos hacen que la producción de estos anticuerpos, su validación y estudio durante los últimos 15 años hayan revolucionado esta patología; han modificado la historia natural de esta enfermedad y son un ejemplo de investigación translacional oncológica (2).

De forma similar a otras neoplasias, los anticuerpos utilizados como marcadores linfoides han sido decisivos para la categorización y el establecimiento de las diferentes entidades linfoproliferativas. Sin embargo, hay que destacar que actualmente el diagnóstico de las neoplasias linfoides humanas es todavía incompleto, especialmente en algunas categorías como los linfomas de células B grandes o los procesos linfoproliferativos T, debido principalmente a un escaso conocimiento de estas entidades y a una ausencia de marcadores específicos.

El avance en los últimos años de las técnicas de IHQ y citogenética (como los *tissue-microarrays* o los estudios de expresión génica masiva mediante *microarrays* de ácido desoxirribonucleico [ADN]) o los avances en el campo de la proteómica han permitido identificar nuevas características moleculares de cada entidad linfoproliferativa. Estos hallazgos hacen posible desarrollar nuevos anticuerpos monoclonales más específicos de cada subtipo de neoplasia linfoide.

El objetivo de este trabajo es el análisis de la expresión, en condiciones normales y tumorales, de algunas proteínas identificadas como esenciales en el desarrollo y la diferenciación linfoide: BCL6, MALT1 y PRDM1/BLIMP1. Para ello, se han utilizado técnicas convencionales de producción de anticuerpos monoclonales y una técnica alternativa de inmunización, denominada inmunización genética. Esta nueva herramienta ha permitido producir nuevos anticuerpos que presentan una alta especificidad frente al antígeno de interés.

Los anticuerpos monoclonales producidos se han caracterizado bioquímicamente empleando técnicas de *western blotting* (WB), inmunoprecipitación (IP) y/o estudios de afinidad. Tras su validación, se han empleado como marcadores para el análisis de la expresión de estas proteínas en tejidos normales, en líneas celulares derivadas de neoplasias linfoides y en un gran número de tumores primarios mediante técnicas de IHQ y de inmunofluorescencia.

Como resultado del trabajo experimental recogido en esta Tesis Doctoral, se ha generado un panel de nuevos marcadores inmunofenotípicos de alta especificidad frente a estas

proteínas. Dichos marcadores pueden utilizarse como herramientas para la identificación de diferentes poblaciones linfoides normales y para el estudio y el diagnóstico de determinadas alteraciones linfoproliferativas derivadas de ellas.

Sin embargo, el aspecto más relevante y práctico de estos estudios es el análisis final de las relaciones existentes entre la expresión de estos marcadores linfoides y el comportamiento clínico de los tumores. Se ha demostrado cómo variaciones en la expresión de algunas de estas proteínas guardan una asociación estadísticamente significativa con una supervivencia reducida. Estas observaciones aportan una base para el futuro desarrollo y diseño de modelos predictivos y pronósticos que pueden proporcionar importantes datos a tener en cuenta en las decisiones terapéuticas en determinadas neoplasias linfoides humanas.

NEOPLASIAS LINFOIDES: INCIDENCIA Y EPIDEMIOLOGÍA

Las alteraciones linfoproliferativas no constituyen una entidad poco prevalente ya que, de acuerdo a los datos del IARC (*International Agency for Research on Cancer*), suponen el 8% de las neoplasias. En nuestra sociedad, la incidencia de las leucemias y de los linfomas ha aumentado considerablemente en los últimos años y ha pasado a convertirse en un problema de salud que está a punto de convertirse en la quinta causa de muerte por cáncer en el mundo, después de los tumores de pulmón, mama, colon y melanoma. En Occidente, se diagnostican cerca de 20 nuevos casos anuales de linfoma por cada 100.000 habitantes y, en general, la incidencia de los linfomas aumenta entre un 3 y un 7% anualmente (3).

Si diferenciamos los dos grandes grupos de linfomas: los linfomas de Hodgkin (LH) y los restantes tipos de linfomas o linfomas no Hodgkin (LNH), se observa que, en conjunto, los LNH son aproximadamente cuatro veces más frecuentes que los LH y tienen asimismo una tasa de mortalidad 7 veces superior que la de éstos (Tabla 1).

Tabla 1: Datos de incidencia y mortalidad en todas las edades. Prevalencia a 5 años en población adulta. Tasa estandarizada por edad respecto a la población mundial [ASR (W)] y proporciones por cada 100.000 habitantes

Cáncer	Incidencia			Mortalidad			Prevalencia 5-años		
	Número	(%)	ASR (W)	Número	(%)	ASR (W)	Número	(%)	ASR (W)
Linfoma Hodgkin	65950	0,5	0,9	25469	0,3	0,3	188538	0,6	3,6
Linfoma No Hodgkin	385741	2,7	5,1	199670	2,4	2,5	832843	2,6	16,0

Datos extraídos de: GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, mortality and prevalence Worldwide in 2012; http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx)

La mayoría de los LNH aparecen en edad adulta (con una media de edad entre 55 y 66 años), aunque algunos tipos se desarrollan de forma preferente en la infancia y otros presentan una característica distribución bimodal; siendo la incidencia discretamente mayor en los varones (1,4:1).

Algunas de las entidades incluidas en el grupo de LNH tienen una distribución geográfica o poblacional peculiar que, probablemente, responde a relaciones etiológicas descritas entre algunos de estos procesos y/o a factores como las radiaciones ionizantes, la exposición a ciertos productos químicos o la infección por determinados virus (VLCTH-1, EBV, VHC, VHH-6 oVHH-8).

Por su parte, los LH representan aproximadamente el 0,5% del total de los casos de neoplasias malignas (a nivel mundial y en la Unión Europea). Se trata de un linfoma poco frecuente antes de los 10 años de edad que presenta una curva de incidencia con distribución bimodal, con un pico entre los 15 y los 34 años y otro después de los 55-60 años, con una incidencia discretamente mayor en los varones (1,4:1) (Datos obtenidos de la *Unit of Descriptive Epidemiology. Cancer Incidence, Mortality, and Prevalence in the European Union*. WHO/IARC: <http://www-dep.iarc.fr>, y de Cancer Research UK: <http://www.cancerresearchuk.org>).

CLASIFICACIÓN ACTUAL DE LOS LINFOMAS

La clasificación de las alteraciones linfoproliferativas (Tabla 2) ha sufrido varias revisiones en los últimos años (2001, 2008 y 2016) (4-12). En el año 1994, la revista *Blood*, publicó la clasificación de linfomas REAL (*Revised European-American Lymphoma Classification*), propuesta por el Grupo Internacional para el Estudio de los Linfomas (ILSG) integrado por expertos de Europa, Estados Unidos y Asia (9). Esta clasificación fue pronto referente para los clínicos, patólogos e investigadores básicos y se consolidó con la clasificación propuesta por la Organización Mundial de la Salud (OMS).

La clasificación de la OMS reconoce tres categorías principales de neoplasias linfoides basándose en la morfología y el linaje celular: las neoplasias de células B, las neoplasias de células T y de células asesinas naturales (o NK - *Natural Killer*), y los linfomas de Hodgkin. Dentro de la clasificación de las neoplasias linfoides se recogen tanto las fases sólidas (linfomas) como las fases circulantes de las neoplasias (leucemias linfoides). La distinción entre linfoma y leucemia linfoide es artificial ya que muchas neoplasias linfoides comprenden ambas fases (sólidas y circulantes).

Según los datos publicados por la OMS, las neoplasias de células B son entre 8 y 9 veces más frecuentes que las de células T y NK, excepto en edad pediátrica, donde los linfomas T son 2 veces más habituales que los B (3, 5, 6, 9). El linfoma más frecuente es el linfoma difuso de células B grandes (LDCBG), que constituye el 40% de los casos de linfoma a nivel mundial, seguido por el linfoma folicular (LF) (13).

Tabla 2: Clasificación de los linfomas de la Organización Mundial de la Salud (OMS).
Actualización 2016 (OMS)

Linfomas de células B maduras

- Leucemia B linfocítica crónica / Linfoma B de linfocitos pequeños
- Linfocitosis B monoclonal
- Leucemia prolinfocítica de células B
- Linfoma esplénico de zona marginal
- Leucemia de células peludas
- Leucemia/Linfoma B esplénico, no clasificable
 - Linfoma esplénico de linfocitos pequeños de la pulpa roja difuso
 - Variante de leucemia de células peludas
- Linfoma linfoplasmacítico.
 - Macroglobulinemia de Waldenström
- Gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI), IgM
- Gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI), IgG/A
- Mieloma de células plasmáticas
- Plasmacitoma óseo solitario
- Plasmacitoma extraóseo
- Enfermedades de depósito de inmunoglobulinas
- Linfoma extranodal de tejido linfoide asociado a mucosa (tipo MALT) de zona marginal
- Linfoma B nodal de zona marginal
- Linfoma folicular
- Linfoma de células B grandes con reordenamiento IRF4
- Linfomas primarios cutáneos de células del centro folicular
- Linfoma de células del manto
 - Neoplasia de células del manto in situ
- Linfoma difuso de células B grandes (LDCBG), no especificado (NOS)
 - Tipo centro germinal
 - Tipo células activadas
- Linfoma de células B grandes rico en células T o histiocitos
- LDCBG primario del sistema nervioso central (SNC)
- LDCBG primario cutáneo, tipo pierna
- LDCBG EBV⁺, NOS
- Úlcera mucocutánea EBV⁺
- LDCBG asociado a inflamación crónica
- Granulomatosis linfomatoide
- Linfoma de células B grandes primario mediastinal (timo)
- Linfoma de células B grandes intravascular
- Linfoma de células B grandes ALK⁺
- Linfoma plasmablastico
- Linfoma de efusión primaria
- LDCBG HHV8⁺, NOS*
- Linfoma Burkitt
- Linfoma tipo Burkitt con aberración 11q
- Linfoma de células B grandes de alto grado, con reordenamiento MYC y BCL2 y/o BCL6
- Linfoma de células B grandes de alto grado, NOS
- Linfoma B, no clasificable, con características intermedias entre LDCBG y LH clásico

Linfomas de linfocitos T y células NK

- Leucemia prolinfocítica de células T
- Leucemia de células T grandes granulares
- Trastornos linfoproliferativos crónicos de células NK
- Leucemia agresiva de células NK
- Linfoma de células T sistémico EBV⁺ de la infancia
- Desorden linfoproliferativo tipo hidroa vacciniforme
- Linfoma/leucemia del adulto
- Linfoma de células T/NK extranodal tipo nasal
- Linfoma T asociado a enteropatía
- Linfoma epiteliotrópico intestinal T monomórfico
- Desorden linfoproliferativo indolente del tracto gastrointestinal
- Linfoma T hepatoesplénico
- Linfoma subcutáneo T paniculítico
- Micosis fungoide
- Síndrome de Sézary
- Desorden linfoproliferativo cutáneo primario CD30⁺
 - Papulosis linfomatosa
 - Linfoma primario cutáneo anaplásico de células grandes
- Linfoma cutáneo primario γδ
- Linfoma primario cutáneo agresivo epidermotrópico de células T citotóxicas CD8+
- Linfoma cutáneo primario acral CD8+
- Desorden linfoproliferativo cutáneo primario de células T pequeñas/medianas CD4+
- Linfoma periférico de células T, NOS
- Linfoma T angioinmunoblastico
- Linfoma T folicular
- Linfoma T nodal periférico con fenotipo TFH
- Linfoma anaplásico de células grandes, ALK+
- Linfoma anaplásico de células grandes, ALK-
- Linfoma anaplásico de células grandes asociado a implante de mama

Linfoma Hodgkin

- Linfoma Hodgkin nodular de predominio linfocítico
- Linfoma Hodgkin clásico
 - Linfoma Hodgkin con esclerosis nodular
 - Linfoma Hodgkin clásico rico en linfocitos
 - Linfoma Hodgkin de celularidad mixta.
 - Linfoma Hodgkin con depleción de linfocitos

Trastornos linfoproliferativos posttrasplante (PTLD, por sus siglas en inglés)

- PTLD Hiperplasia plasmacítica
- PTLD Mononucleosis infecciosa
- PTLD Hiperplasia folicular florida
- PTLD polimórfica
- PTLD monomórfica (tipo células B- y células T-/NK-)
- PTLD Linfoma Hodgkin clásico

Fuente: Adaptado de Swerlow et al. Blood_2016 (11)

Esta clasificación de la OMS en la que se integran criterios clínicos, morfológicos, inmunofenotípicos, citogenéticos y moleculares permite un diagnóstico más específico de los linfomas y un pronóstico más fiable, así como la elección del tratamiento más adecuado para cada paciente.

Pese al importante esfuerzo realizado para una clasificación más precisa de las neoplasias linfoides humanas, hay que resaltar que actualmente aún se presentan serias dificultades diagnósticas en estas neoplasias. Destacan las encontradas en algunas categorías como los linfomas de células B grandes o los procesos linfoproliferativos T, debido principalmente a un conocimiento incompleto de estas entidades y a la ausencia de marcadores específicos que faciliten el reto diagnóstico rutinario al que se enfrentan los clínicos y anatomicopatólogos.

BASES CTOEVOLUTIVAS Y FUNCIONALES DE LOS LINFOMAS

La fisiología normal del sistema linfoide es un complejo entramado biológico del que son protagonistas diversos tipos celulares, lugares anatómicos y múltiples mecanismos moleculares de control y regulación. Esta complejidad explica la dificultad que supone el estudio de los mecanismos patogénicos que conducen al desarrollo de un linfoma.

Por otro lado, es necesario destacar que, actualmente, los linfomas son contemplados como tumores con una histogénesis donde las células tumorales reproducen en buena medida la morfología, el inmunofenotipo y el comportamiento de sus contrapartidas normales. Además, la patogenia de un grupo tan heterogéneo de enfermedades, como son los linfomas, no puede explicarse a través de un único mecanismo, sino que, durante la linfomagénesis, están implicadas muy diversas alteraciones genéticas y moleculares.

Todo ello hace imprescindible el conocimiento de la arquitectura y del desarrollo del sistema linfoide en condiciones normales para comprender el proceso de linfomagénesis y el comportamiento de estos tumores.

Desarrollo, maduración y diferenciación normal de los linfocitos B: el centro germinal

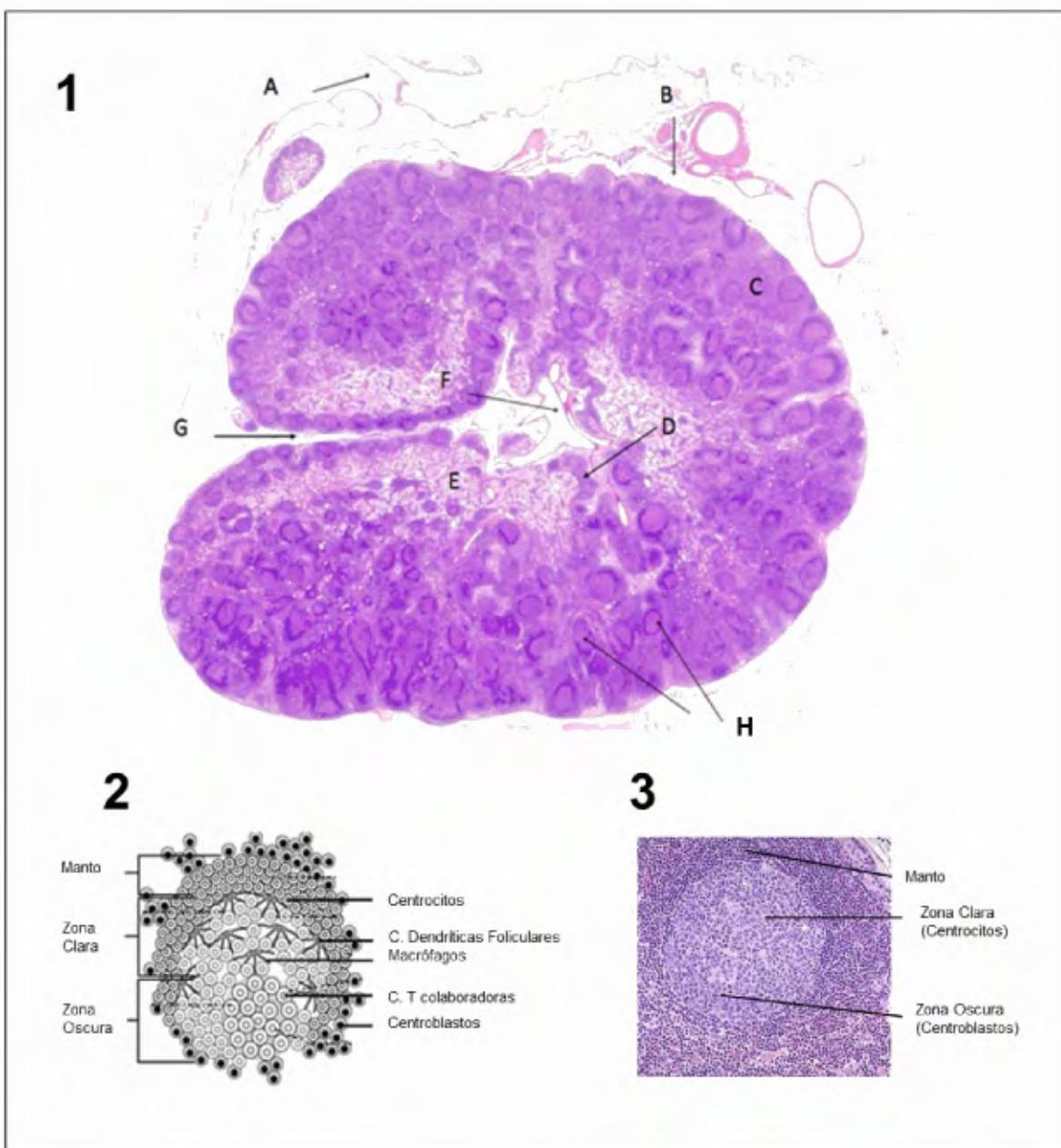
El desarrollo y la maduración normal de los linfocitos B en humanos se inicia en los órganos linfoides primarios, hígado fetal y médula ósea (MO) y culmina con la expresión en membrana del receptor de células B (BCR). Las células que expresan un receptor de células B funcional y que no sea autorreactivo se diferencian en células B maduras vírgenes y salen de estos órganos linfoides primarios. Por el contrario, los precursores de células B que fallan en la expresión del receptor mueren por apoptosis.

La segunda fase de maduración del linfocito B se produce de manera dependiente de antígeno y de las células T en los órganos linfoides secundarios, principalmente en los ganglios linfáticos, el bazo, las amígdalas, el tejido linfoide asociado a mucosas (MALT, por sus siglas en inglés) y en la MO. Estos órganos linfoides secundarios proporcionan el entorno adecuado para que los linfocitos interaccionen entre sí, con las células presentadoras de antígenos y con otras células accesorias.

El ganglio linfático es la estructura linfoide organizada más relevante a la que llegan los antígenos procedentes de los tejidos. Histológicamente, el ganglio linfático se puede dividir en corteza, médula y senos (marginales y medulares). La corteza está constituida por folículos primarios y folículos linfoides secundarios (Figura 1). Los folículos linfoides secundarios se forman a partir de los folículos primarios, donde las células B maduras vírgenes se activan por la unión del antígeno a su receptor y sufren una expansión clonal.

Los folículos linfoides secundarios constan del centro germinal (CG) y del manto folicular. El CG de un folículo linfoide secundario está constituido principalmente por dos tipos de linfocitos B (centroblastos y centrocitos), linfocitos T pequeños, células T colaboradoras del CG, células dendríticas centrofoliculares y macrófagos. Los dos tipos de linfocitos B en el CG se diferencian histológicamente en los centroblastos que se distribuyen en el CG formando una corona que se denomina “zona oscura”, mitóticamente muy activa y los centrocitos que se agrupan formando la denominada “zona clara” con un índice mitótico inferior (Figura 1).

Figura 1: Estructura anatómica y composición celular de los ganglios linfáticos.

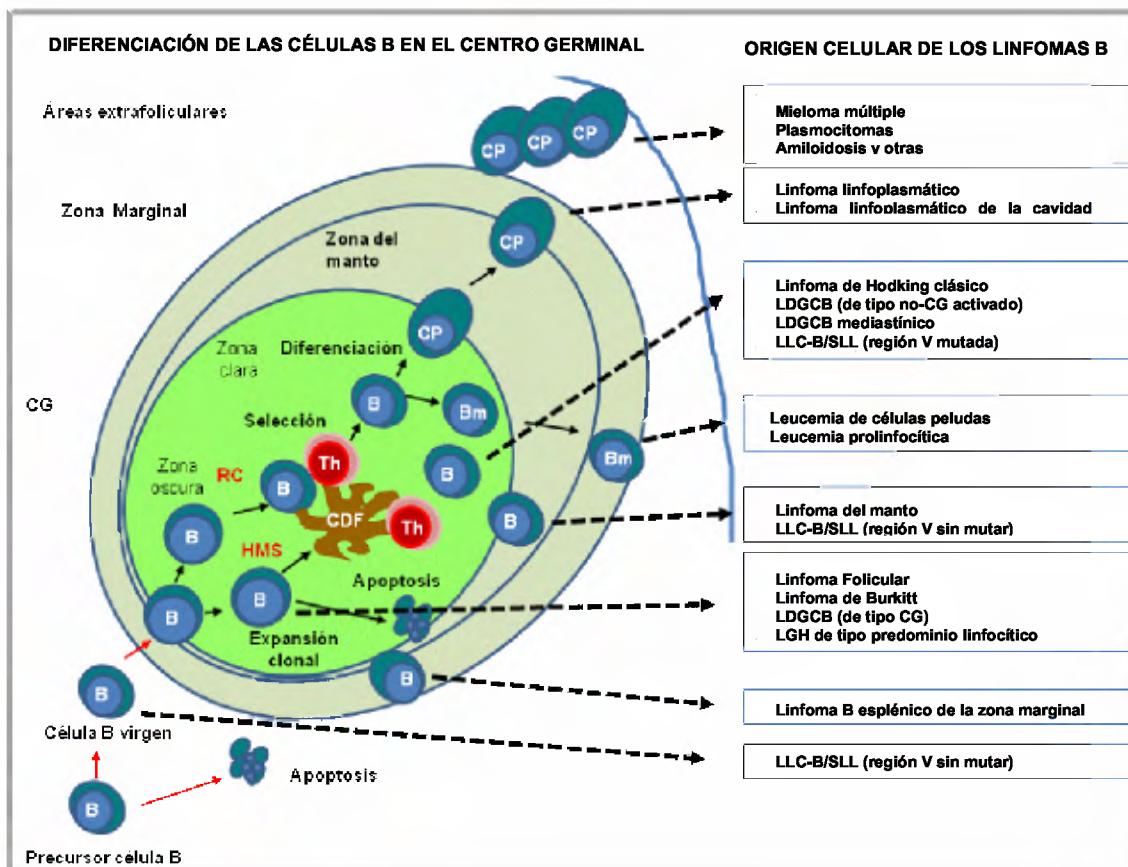


1: Estructura anatómica del ganglio linfóide teñido con hematoxilina y eosina, donde se distinguen las diferentes partes que lo componen: A: venas y arteriolas, B: tejido adiposo, C: corteza, D: médula, E: parénquima linfático, F: vasos linfáticos, H: centros germinales, G: hilio. 2 Esquema representativo de la localización y composición celular en los centros germinales de los ganglios linfáticos. 3 Imagen de hematoxilina y eoxina de un centro germinal. Fuente: esquema adaptado de Finn Geneser - Atlas color de histología (14).

Los procesos de activación, proliferación y diferenciación del linfocito B maduro ocurren durante su paso a través del CG en el folículo linfóide. En el CG se produce la exposición antigenica de forma dependiente de las células T colaboradoras del CG y el linfocito B maduro va pasando por las diferentes fases de maduración: célula B virgen, centroblasto, centrocito, célula B de memoria o célula plasmática productora de anticuerpos. Durante este

tránsito en los CG, los genes de las inmunoglobulinas (Ig) son modificados por los procesos de *hipermutación somática* y el *cambio de clase*. Además, en los CG tienen lugar los procesos de *selección antigenérica positiva y negativa*, de modo que aquellos cambios que den lugar a linfocitos ineficaces o autorreactivos mueren por *apoptosis* (Figura 2). El proceso concluiría con una respuesta inmune generalizada frente al antígeno.

Figura 2: Origen celular de los linfomas B y su relación con los folículos linfoides.



Representación esquemática del desarrollo del linfocito B y su relación con la histogénesis de las neoplasias linfoides. Las células tumorales reproducen en buena medida la morfología, el inmunofenotipo y el comportamiento de sus contrapartidas normales. Abreviaturas: HMS: hipermutación somática, RC: Recombinación de cambio de clase, Th: células T helper o T colaboradora, CDF: célula dendrítica folicular, Bm: célula B de memoria, CP: célula plasmática, LLC-B/SLL: leucemia linfática crónica, LH: linfoma de Hodgkin, LDGCB: linfoma B difuso de célula grande, CG: centro germinal. Esquema adaptado de Blum KS et al. 2006 (15).

Mecanismos de generación de neoplasias linfoides

El hecho de que cerca del 95% de los linfomas sean de origen B y que el resto derive principalmente de células T, puede parecer sorprendente a primera vista dada la frecuencia similar de células B y T normales en el cuerpo humano. Sin embargo, es comprensible si se consideran los diferentes factores que influyen en la patogénesis de los linfomas B y si se relacionan con el desarrollo normal de las células linfoides B.

Los diferentes subtipos de linfomas B muestran un extraordinario paralelismo con las diferentes fases del proceso madurativo de las células linfoides B normales (Figura 2). En la mayoría de las entidades es posible hallar una correlación entre los hallazgos clínicos, inmunofenotípicos, moleculares y morfológicos de los diversos síndromes linfoproliferativos con las células linfoides que corresponden a su contrapartida normal (16). Por ejemplo, algunos linfomas con tendencia a la expresión leucémica, como las leucemias linfocíticas crónicas, derivan de un pool de células B recirculantes. Por otra parte, los linfomas de la zona marginal exhiben el mismo gradiente morfológico y fenotípico que los linfocitos B normales que ocupan la zona marginal. De la misma forma, el crecimiento de la mayoría de los linfomas B requiere una serie de factores clave en el desarrollo, la diferenciación y la supervivencia de las células B normales. Basándose en estas observaciones, ha sido propuesto que las células B malignas están paradas o “congeladas” en una etapa concreta de la diferenciación, la cual es reflejo de su origen (Figura 2) (16).

El hecho de que la mayoría de los linfomas B deriven de las células B del CG o de las células B que han pasado a través del mismo, muestra el importante papel que juega el CG en la patogénesis de estos linfomas (17). Estudios de expresión génica masiva de linfomas B humanos y células B normales han permitido clarificar el origen de los linfomas B e identificar distintos subgrupos de linfomas que previamente no se habían reconocido. Así, por ejemplo, estudios de expresión génica de células B de CG mostraron una asociación con los LF, linfomas de Burkitt y un grupo de los LDCBG, aportando nuevos datos respecto al origen de estos tumores (18, 19). Estos tipos de estudios mostraron además otras relaciones no esperadas, como en las leucemias linfocíticas crónicas, donde las células que presentaban la región génica V de las Ig mutada eran muy similares a las células B de memoria que sufren hipermutación somática, lo que indica que podrían estar relacionados con esta población celular (20).

El proceso por el que se genera una neoplasia linfóide, como en la mayoría de los cánceres humanos, es debido a la acumulación progresiva y clonal de varias lesiones genéticas que afectan a proto-oncogenes y genes supresores de tumores. A diferencia de otros tumores, en los linfomas el genoma es relativamente estable y las células linfomatosas se caracterizan por pocas, a veces una sola, anomalías genéticas no aleatorias.

El mecanismo más estudiado de activación de proto-oncogenes en los linfomas son las translocaciones (21), principalmente aquellas translocaciones cromosómicas que se desarrollan entre uno de los loci de las Ig y el de un proto-oncogén (22, 23). Como consecuencia de las translocaciones, el oncogén queda bajo control de locus activo de la Ig, con lo que se desregula su expresión, expresándose el oncogén de forma constitutiva. Aunque el mecanismo por el que se desarrollan estas translocaciones no se conoce con exactitud, existe una clara relación con los mecanismos por los que se remodelan los genes de las Ig, incluyendo la recombinación V(D)J, el cambio de isotipo y la hipermutación somática. El denominador común de estos procesos es el hecho de que se generan intrínsecamente roturas de la doble cadena de ADN y puesto que el cambio de isotipo y la hipermutación somática tienen lugar principalmente en los CG, el origen de un gran grupo de linfomas B es de las propias células B del CG, donde estos procesos tienen lugar.

Junto las translocaciones, existen otras alteraciones genéticas capaces de conferir un fenotipo maligno a las células linfoides. El proceso de hipermutación somática puede contribuir a la linfomagenésis al provocar translocaciones cromosómicas, pero también al producir mutaciones en otros genes diferentes a los de las Ig. Un ejemplo es el caso de los genes *BCL6* o *CD95* (conocido como *FAS*), que presentan mutaciones en las células B del CG y de memoria normales. *BCL6* es un represor transcripcional que se expresa en el tejido linfóide, fundamentalmente en las células B y T del CG y en timocitos corticales. Interviene en la formación de los CG (24) y en la respuesta inmune mediada por células T (25). *CD95* es un receptor de membrana que pertenece a la superfamilia de receptores del factor de diferenciación tumoral (TDFR). Cuando *CD95* es activado se produce una cascada de interacciones que conlleva a la activación de la caspasa 8 que promueve la muerte por apoptosis.

En ocasiones, durante la hipermutación somática, se pueden provocar translocaciones, como ocurre con la región 5' del gen de *BCL6*, un punto de frecuente de rotura (26-28). También se pueden provocar mutaciones de inactivación, como en el caso de *CD95*, con lo que se protege a las células cancerosas de la apoptosis inducida por células que expresan el ligando de *CD95* (29).

Finalmente, indicar que existen otros mecanismos que pueden estar implicados en la patogénesis de los linfomas como: mutaciones en genes supresores de tumores (como ocurre con *p53* en los LF (30)), amplificaciones genómicas (como el caso del proto-oncogén *REL [subunidad NF-κB]* (30), implicado en proliferación y linfopoyesis), translocaciones que no dependen del gen de las Ig (como *API2-MALT* (31), proteína de fusión resultado de la translocación t(11;18)(q21;q21) que comprende el extremo N-terminal del inhibidor de apoptosis 2 (API2) y el extremo C-terminal de MALT1, molécula adaptadora que participa en la señalización NF-κB) o infecciones por virus, que pueden provocar la transformación de las células linfoides (como el virus de Epstein-Barr [EBV], en los linfomas de Burkitt (5); o el HTLV-1 en las leucemias/linfomas de células T del adulto (5)).

Aplicaciones del marcaje inmunofenotípico en el estudio de los linfomas

Las aplicaciones del marcaje inmunofenotípico son muy variadas, siendo esenciales en el diagnóstico y en la clasificación de los diferentes desordenes linfoproliferativos. Las principales aplicaciones de los marcadores inmunofenotípicos en el estudio de los linfomas vienen resumidas en la Tabla 3.

Tabla 3: Aplicaciones del marcaje inmunofenotípico al estudio de los linfomas.

- Determinar el linaje de célula B o T de una población linfoide anormal.
- Determinar la clonalidad de la proliferación linfoide, especialmente en linfomas de origen B.
- Determinar si las células linfoides tienen un fenotipo asociado a un linfoma específico o a una alteración cromosómica particular.
- Establecer el fenotipo de las células linfoides neoplásicas, lo que es útil para la clasificación, tratamiento y monitorización de la enfermedad mínima residual.
- Estudiar la expresión de moléculas específicas que pueden ser dianas de inmunoterapia (por ejemplo, CD20 con rituximab).
- Detectar marcadores que ayuden a determinar el pronóstico. Incluyendo marcadores de agresividad del tumor (por ejemplo, expresión de Ki67/MIB asociado a mayor proliferación) y marcadores de la respuesta inmune asociada a ese tumor y que se asocian a un mejor o peor pronóstico.

Fuente: Adaptado de “The World Health Organization classification of neoplasms of the hematopoietic and lymphoid tissues” Cham JK et al. Hematol Oncol. 2001 (32)

Como hemos visto anteriormente en la clasificación actual de los linfomas, el inmunofenotipo ha sido crucial para la categorización y el establecimiento de las diferentes entidades y permite un diagnóstico rutinario cada vez más preciso de los diferentes desordenes linfoproliferativos. Actualmente, no existe un anticuerpo que, por sí sólo, sea específico para el marcaje de una célula linfoide maligna, por lo que se utilizan patrones de expresión antigénica que permiten la clasificación de los diferentes linfomas. Se emplean diferentes paneles de anticuerpos para determinar el linaje celular, el estado de diferenciación y la clonalidad, especialmente en células B. Para la mayoría de los análisis se utiliza un panel con un número limitado de anticuerpos, que podrían incluir anticuerpos presentes en todos los estadios del linaje B (pan-B [por ejemplo CD19, CD20 y CD79a]) y del linaje T (pan-T [por ejemplo CD3 y CD5]).

Si la morfología sugiere un desorden linfoproliferativo concreto con unas características fenotípicas (por ejemplo, de leucemia de células peludas), entonces se incluyen otros anticuerpos (por ejemplo, CD11c, CD25 o CD103). El número y el rango óptimo de anticuerpos para evaluar un desorden linfoproliferativo son discutibles, sin embargo, existen una serie de anticuerpos usados comúnmente y que se resumen en la Tabla 4.

A pesar de la posible aplicación de estos marcadores inmunohistoquímicos para el diagnóstico de los linfomas, en la actualidad no hay disponibles marcadores para todos los tipos de linfomas. Esto dificulta el estudio y la identificación de estos linfomas en rutina diagnóstica.

De forma adicional, diversas categorías tradicionales han sido subdivididas recientemente en subgrupos por presentar una clínica distinta. Por ejemplo, los linfomas de la zona marginal, las LLC-B/SLL o los LDCBG actualmente se subdividen en al menos dos subgrupos. Así, diferentes artículos muestran como, por ejemplo los LDCBG de CG pueden ser detectados por IHQ de BCL6 y de CD10 (33). A pesar de ello, esta categorización no es exacta, por lo que suscitan gran interés los nuevos marcadores inmunofenotípicos de estas subcategorías.

Tabla 4: Principales características inmunofenotípicas de los linfomas.

<i>Proceso linfoproliferativo</i>	<i>Características inmunofenotípicas</i>
Linfoma/leucemia B linfoblástico	CD20-/, CD79a+, CD10+/-, TdT+
Leucemia linfocítica crónica B /	CD20+, CD5+, CD10-, CD23+, ciclina D1-, BCL6-, LEF1+
Linfoma de linfocitos pequeños	
Linfoma de células del manto	CD20+, CD5+, CD10-, CD23-, ciclina D1+, BCL6-
Linfoma B de la zona marginal	CD20+, CD5-, CD10-, ciclina D1-, BCL6-
Linfoma folicular	CD20+, CD5-, CD10+, BCL6+, BCL2+, ciclina D1-
Linfoma linfoplasmacítico	CD20+, CD5-, CD10-, clg+
Plasmocitoma	CD20-, CD45RB-, clg+, CD79a+
Linfoma difuso de células B grandes	CD20+, CD5-/, CD10-/, BCL6+/-, clg-/+
Linfoma de Burkitt	CD20+, CD5-, CD10+, BCL2-, MIB1++
Linfoma/leucemia linfoblástica T	CD3+, CD7+, CD4-/, CD8-/, TdT+
Micosis fungoide / Síndrome de Sézary	CD3+, CD4+, CD8-, CD7-/, TCRδ-
Linfoma extranodal NK/T, tipo nasal	CD2+, CD3-/+ (citoplásmico), CD5-, CD4/8-, CD56+, EBER+, TIA-1+, TCRδ-
Linfoma T angioinmunoblastico	CD3+, CD4+, CD8-, TCRδ-, presencia de marcadores TFH
Linfoma T subcutáneo tipo-paniculítico	CD3+, CD4-, CD8+, TIA-1+, TCRδ- (casos occidente +), CD56-/, EBER-
Linfoma T γδ hepatoesplénico	CD3+, CD4-, CD8-/, TIA-1+, TCRδ+, CD56+/-, EBER-
Linfoma T intestinal, tipo asociado a enteropatía	CD3+, CD4-, CD8+, TIA-1+, EBER-, CD103+
Linfoma anaplásico de célula grande, sistémico	CD3-/, CD15-, CD30+, EMA+/-, ALK+/-, TIA-1+/-, EBER-
Linfoma T periférico NOS	CD3+/-, CD4>CD8, CD5+/-, CD7-/, TIA-/-

Fuente: Adaptado de “The World Health Organization classification of neoplasms of the hematopoietic and lymphoid tissues” Cham JK et al. Hematol Oncol. 2001 (32)

La producción de anticuerpos monoclonales se ha redimensionado en los últimos años. Esto se debe a los resultados de diferentes estudios en los que, mediante citogenética y estudios de clonaje genético y secuenciación, se definen múltiples alteraciones genéticas en los linfomas. También es motivo de ello el reciente desarrollo de la proteómica y de técnicas para el estudio de expresión génica masiva mediante microarrays de ADN con las que se compara la expresión de grupos de genes y proteínas en diferentes tipos celulares, en diferentes estadios de maduración y/o diferenciación, o incluso entre células tumorales y sus homólogas normales. El interés se centra en la producción de aquellos anticuerpos monoclonales que reconozcan las

proteínas sobre-expresadas en alteraciones neoplásicas y que pueden constituir novedosos marcadores inmunofenotípicos.

Finalmente, es esencial correlacionar toda la información de la que se dispone a nivel genético con el marcaje inmunohistoquímico para validar estos datos y para desarrollar tests que detecten estas anomalías genéticas. Así por ejemplo, la introducción del marcador de la kinasa ZAP-70 como marcador de LLC-B/SLL con la región génica de las Ig sin mutar, fue promovida por estudios de expresión génica masiva que demostraban un comportamiento clínico menos favorable (34). También es importante tener en cuenta que no siempre se puede asumir que las alteraciones en la expresión génica correlacionan con la expresión proteica identificada por IHQ en muestras de rutina, por lo que es necesario comparar los datos de expresión génica con los patrones inmunofenotípicos.

DESARROLLO DE NUEVOS MARCADORES DE TEJIDO LINFOIDE HUMANO: BCL6, MALT1 y PRDM1/BLIMP1

La necesidad de marcadores que faciliten el diagnóstico y permitan una mayor individualización de los tratamientos oncológicos de los linfomas es actualmente el motor de numerosas líneas de investigación. Los resultados del trabajo experimental que han permitido la elaboración de esta Tesis Doctoral se basan en el desarrollo de nuevos marcadores frente a proteínas clave en el desarrollo y diferenciación linfoide, concretamente frente a las proteínas: BCL6, MALT1 y PRDM1/BLIMP1 y a la investigación de sus potenciales aplicaciones en el estudio de los neoplasias linfoideas.

El represor transcripcional BCL6 y su relación con las neoplasias linfoideas

La proteína BCL6 es una proteína reguladora que se identificó inicialmente a través de las translocaciones cromosómicas que afectan a la región 3q27, presentes en un grupo de LF y en los LDCBG (35). El gen *BCL6* codifica una proteína de 706 aminoácidos y 95 kD que funciona como un represor transcripcional. La proteína BCL6 posee dos dominios funcionales importantes: el extremo C-terminal con seis dedos de zinc, que median su interacción con el ADN y un dominio en la región N-terminal, llamado dominio BTZ/POZ hidrofóbico, que media la interacción con otras proteínas relacionadas. BCL6 se caracteriza por ser una proteína multifuncional que regula principalmente genes implicados en diferenciación de células B (como *PRDM1/BLIMP1*, *IP-10*, y otros) o en el control del ciclo celular (como *c-myc*, *p27* o *ciclina D2*) y de la respuesta inmune (36, 37).

BCL6 se expresa en el tejido linfoide, fundamentalmente en las células B y T del CG y en timocitos corticales; participa en la formación de los CGs (24) y se requiere para la respuesta inmune mediada por células T (25). Su expresión selectiva por las células del CG hace que sea considerado como un marcador de neoplasias originadas de células B del GC. BCL6 se expresa en el 100% de los LF, en el 100% de los linfomas de Burkitt, en más del 75% de los LDCBG y en más del 80% de las formas de predominio linfocítico del LH (38, 39). Por el contrario, sólo se detecta en una pequeña fracción de las formas clásicas de LH y no se expresa en el resto de los procesos linfoproliferativos B de células pequeñas, con la excepción del LF. A modo de ejemplo, indicar que la expresión de BCL6 en la mayoría de los casos de LH de tipo predominio linfocítico y en una fracción de las formas clásicas de la enfermedad ha sido considerada como una evidencia adicional del origen centrofolicular de esta neoplasia (40).

Se identifican reordenamientos de *BCL6* (principalmente, translocaciones afectando la región 5' no codificante) en el 20-40% de los LDCBG y en el 6-14% de los LF (41-44). Se han descrito mutaciones somáticas en el gen *BCL6* en células B normales del CG, en LDCBG y en LF; estas mutaciones parecen que pueden contribuir a la sobreexpresión de BCL6, independientemente de la presencia de translocaciones cromosómicas (27, 28, 38, 44-48).

La expresión de BCL6 tiene además un importante valor pronóstico y se considera un predictor independiente de la supervivencia global (SG) en LDCBG, de forma que altos niveles de expresión de BCL6 se asocian a un pronóstico más favorable (49).

Todos estos estudios indican un papel central de BCL6 en la histogénesis de estos linfomas, donde pueden existir diversos mecanismos que alteran su expresión. Los anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente la proteína BCL6 se han convertido por tanto en herramientas indispensables para el estudio, diagnóstico, pronóstico y clasificación de las neoplasias linfoides B (21).

La importancia del biomarcador BCL6 en el desarrollo linfoide y en el estudio de las neoplasias linfoides le sitúan como un marcador ideal para realizar una primera validación y optimización de la inmunización genética como metodología para la inmunización de ratones con el objetivo de producir anticuerpos monoclonales más sensibles y específicos aplicables en la rutina diagnóstica.

MALT1, paracaspasa esencial en la activación del sistema inmune mediante el factor de transcripción NF-κB.

La proteasa MALT1 (Mucosa Associated Lymphoid Tissue lymphoma translocation 1) es una proteína señalizadora intracelular importante en inmunidad, inflamación y neoplasias linfoides (50). Participa en la activación de linfocitos, células mieloides y NK. Estructuralmente tiene varios dominios, 1 dominio N-t de muerte celular, 2 dominios tipo Ig, 1 dominio catalítico central homólogo al de las proteasas de la familia caspasas y otro dominio tipo Ig.

MALT1 es una de las proteínas implicadas en las vías de señalización de los inmunorreceptores con el motivo ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*), estos receptores están presentes en las células T y B (BCR y TCR) así como en células NK, células mieloides y mastocitos (51). Estudios genéticos utilizando ratones deficientes de *MALT1* corroboran su papel esencial en la activación inducida por receptores ya que dichos ratones son inmunodeficientes y presentan alterado el desarrollo de diferentes tipos de células B, de células de la zona marginal y de células T reguladoras. También se ha descrito en humanos que la falta de la actividad MALT1 produce inmunodeficiencia, caracterizada por infecciones graves recurrentes y respuesta inmune (celular y humoral) inadecuada, a pesar de presentar un número normal de células T y B. Probablemente esto sea como consecuencia de la incorrecta señalización de los receptores BCR y TCR durante el desarrollo de los linfocitos (52).

MALT1 interviene en la activación de los linfocitos T pero su papel en la activación de los linfocitos B es aún controvertido (50). Interviene en dicha activación mediante dos vías, cada una con una actividad diferente (Figura 3).

La primera actividad de MALT1 en ser descubierta fue la de reclutar proteínas (proteína *scaffold*). MALT1 agrega a proteínas necesarias para la activación de NF-κB y JNK. Para la activación de NF-κB vía canónica, MALT1 participa en la formación del complejo CBM, junto con las proteínas CARMA1/CARD11 y Bc10. Tras la activación TCR/BCR, se produce la fosforilación de CARMA1 por la quinasa PKC (β en el caso de células B o θ para células T) y se forma el complejo CBM. Una vez formado el complejo se une a él la E3 ligasa TRAF6 que se activa mediante oligomerización. TRAF6 activada poliubiquitina MALT1 lo que le permite reclutar a NEMO, proteína modulador esencial de NF-κB. TRAF6 también poliubiquitina a NEMO, hecho que facilita el reclutamiento y la activación del complejo IKK, y a la quinasa TAK1, que fosforila a IKK α e IKK β activando el complejo IKK. Finalmente, el complejo IKK fosforila al inhibidor de NF-κB, I κ B, lo que conlleva su degradación vía proteasoma. NF-κB queda libre en el citoplasma y se trasloca al núcleo donde promueve la expresión de los genes diana (Figura 3A) (51).

Figura 3: Activación de linfocitos dependiente de MALT1.

3A MALT1, proteína scaffold

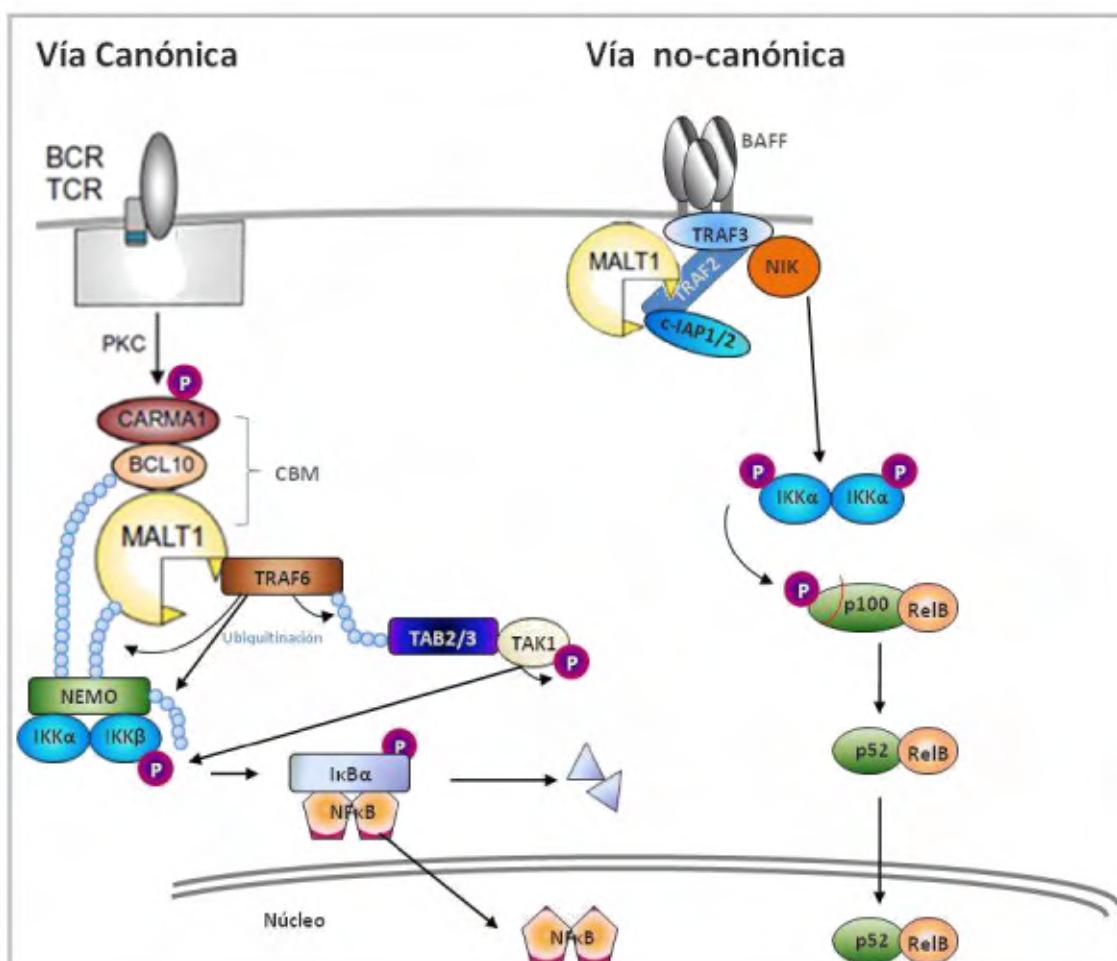


Figura adaptada de: Demeyer, 2016 (50); Jaworski, 2016 (52) y Afonina, 2015 (51). Mediante la función scaffold, MALT1 recluta a la ligasa TRAF6 y a la Ser/Thr quinasa TAK1, proteínas que promueven la activación del complejo IKK. Este complejo fosforila al inhibidor I κ B, lo que conlleva a su degradación, y se produce la activación de NF- κ B.

En las células B, MALT1 activa la vía no canónica de NF- κ B tras la estimulación del receptor del factor activador de células B (BAFF-R), vía que es necesaria para la supervivencia en las células B de la zona marginal. Tras la estimulación de BAFF-R, se reclutan TRAF2, TRAF3 y c-IAP1/2. La unión de MALT1 a TRAF3 facilita la ubiquitinilación y degradación de TRAF3 lo que resulta en la estabilización de la quinasa NIK que fosforila y activa a IKK α . A su vez, IKK α fosforila a la proteína p100 que conlleva su procesamiento a su forma activa p52. Esta subunidad junto a RelB forman el heterodímero con actividad transcripcional (NF- κ B) y se trasloca al núcleo (50). También se ha descrito, dentro de la actividad reclutadora, la interacción de MALT1 con la caspasa 8, por un lado de forma directa tras acoplarse al TCR (esta interacción promueve la actividad autocatalítica de la caspasa 8) y por otro lado,

interaccionando con el complejo Bcl10/MALT1 (activando a la caspasa 8 para el procesamiento de c-FLIP, un homólogo proteolíticamente inactivo, importante en la proliferación de linfocitos) (51).

Figura 3: Activación de linfocitos dependiente de MALT1

3B MALT1, proteasa

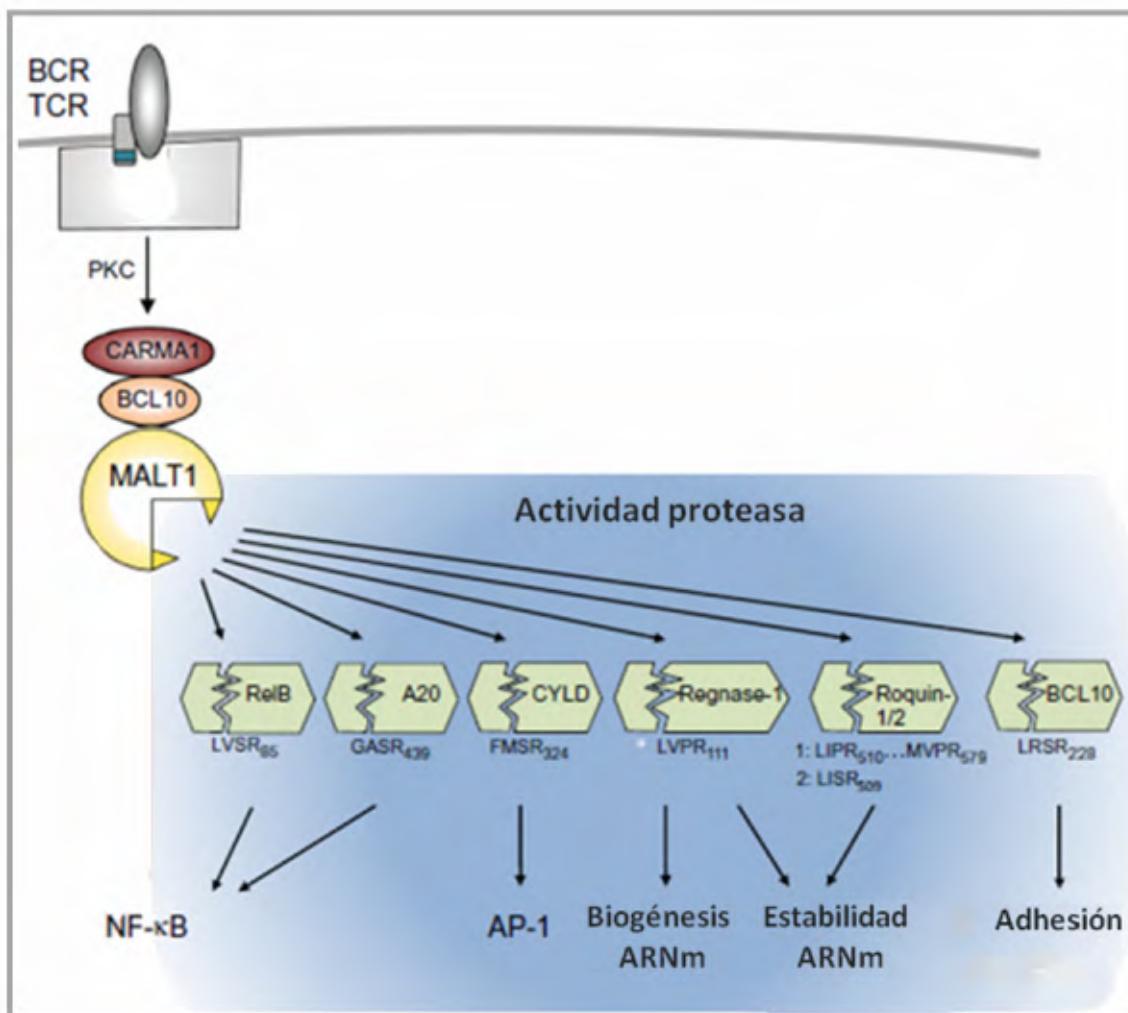


Figura adaptada de: Jaworski, 2016 (52). Mediante la proteólisis de diferentes sustratos, MALT1 controla la activación de NF-κB, AP-1, la estabilidad de ARNm y la adhesión celular.

La otra actividad descrita de MALT1 es la proteolítica (Figura 3B), que está implicada en adhesión, inflamación, muerte y proliferación celular (51). Esta actividad está controlada por la mono-ubiquitinación de un residuo en el extremo C-terminal (Lys644); previniendo esta mono-ubiquitinación se puede anular su capacidad proteolítica de MALT1.

A diferencia de las caspasas que proteolizan tras un residuo negativamente cargado (aspartato), MALT1 proteoliza tras un residuo cargado positivamente (arginina). Entre los sustratos de MALT1 se encuentran (50) (52):

- A20 (enzima deubiquitinante), su proteólisis implica su inactivación y aunque se desconoce el mecanismo exacto, promueve la activación de NF-κB.
- RelB (sub-unidad de NF-κB que actúa como regulador negativo de la vía canónica de NF-κB formando heterodímeros inactivos RelA/RelB y/o compitiendo por el sitio de unión al ADN). Su proteólisis implica su inactivación y degradación, promoviendo la activación de la vía canónica de NF-κB y la supervivencia en líneas celulares de linfoma tipo MALT.
- MALT1; su autoproteólisis promueve la disociación de Bcl10 y la activación de NF-κB independientemente de Bcl10, consiguiendo una expresión óptima de los genes diana de NF-κB.

La proteólisis de estos tres sustratos expande la amplitud y la duración de la activación de NF-κB. Esto provoca a su vez la activación de citoquinas y proteínas anti-apoptóticas que conlleva a la activación, proliferación y supervivencia de las células inmunes activadas mediante receptor (dependiente de ligando). Se permite por tanto que se genere una respuesta inmune eficiente (52).

- CYLD (deubiquitinasa [gen supresor de tumores] que regula negativamente la vía de señalización JNK/AP-1 y la activación de NF-κB). Su proteólisis implica su inactivación; se promueve la fosforilación de JNK inducida por TCR, y la expresión de IL-8 y c-jun.
- Reganasa-1 (proteína importante en la degradación del ácido ribonucleico [ARN]-RNAsa). Su proteólisis implica su inactivación lo que promueve la estabilización de los ARNm de las células T efectoras (*c-Rel*, *Ox40*, *IL-6* e *IL-2*) y de los mensajeros (ARNm) de factores de diferenciación de las células Th17 (IκB ξ , I ξ BNS, ICOS, IRF4).
- Roquin-1 (promueve la deadenilación del ARN). Su proteólisis implica su inactivación, lo que promueve la estabilización de los ARNm de células Th17 (IL-6, ICOS, c-Rel e IRF4).
- Bcl10. Su proteólisis implica su inactivación lo que promueve la adhesión de células T a fibronectina (el mecanismo está aún sin determinar).

MALT1 fue identificado como un gen alterado en el linfoma B tipo MALT hace más de una década. Posteriores investigaciones establecieron la asociación de la activación oncogénica de MALT1 con el desarrollo de linfomas de células B, caracterizados por translocaciones cromosómicas o mutaciones puntuales que activan directamente a MALT1 o a sus activadores. Entre esos linfomas se encuentran los LDCBG ABC, los linfomas tipo MALT y los de células

del manto. En los LDCBG ABC, varias de las mutaciones que caracterizan este linfoma (CD79A/B, CARMA1, A20, MYD88) conllevan a la activación constitutiva de MALT1. En el caso de los linfoma tipo MALT, que presentan constitutivamente activada la proteína MALT1, se han descrito dos mutaciones de MALT1, dos translocaciones cromosómicas: t(14;18)(q32;21) y t(11;18)(q21;q21). La translocación t(14;18)(q32;21) coloca al gen bajo el control de un promotor de un gen de cadena pesada de las Ig, lo que conlleva la sobreexpresión de MALT1 y una activación sostenida de NF-κB; de este modo, se promueve la proliferación y la supervivencia de linfocitos sin la necesidad de señalización previa. En relación a la otra translocación cromosómica t(11;18)(q21;q21), ha sido identificada en una gran proporción de casos con estadios avanzados de la enfermedad. Esta translocación codifica para la proteína de fusión oncogénica IAP2-MALT1, compuesta por el extremo N-terminal de IAP2 (proteína que inhibe la apoptosis) unida al extremo C-terminal de la proteína MALT1. La proteína IAP2-MALT1 esta constitutivamente activa y es capaz de estimular NF-κB, independientemente de la activación de las moléculas que quedan por encima de la vía de señalización. Adicionalmente, la oncoproteína IAP2-MALT1 en las células malignas, mediante su actividad proteasa, proteoliza diferentes sustratos como la quinasa NIK y la proteína supresora de tumores asociada a citoesqueleto LIMA1α. Al proteolizar NIK se promueve su estabilización lo que favorece la activación vía no canónica de NF-κB, la adhesión en células B y la resistencia a apoptosis. Al proteolizar LIMA1α se produce su inactivación, los fragmentos tienen propiedades oncogénicas que promueven la proliferación, la adhesión y la transformación celular (tumorigenicidad) (50, 52).

La inhibición de la actividad proteolítica de MALT1 se plantea como una prometedora terapia eficaz para los diferentes subtipos de linfomas con MALT1 activado (LDCBG, linfoma tipo MALT y linfoma de células del manto). El primer inhibidor de MALT1 fue descrito en 2009 frente a un subtipo de líneas celulares derivadas de LDCBG (53).

Aún está por esclarecerse muchas funciones de MALT1 en los diferentes tipos celulares normales y en sus contrapartidas neoplásicas. Quedan muchas incógnitas en lo referente al repertorio de sustratos de MALT1, así como, a las posibles vías de señalización en las que está involucrada y a las funciones biológicas asociadas. Disponer de nuevos anticuerpos monoclonales específicos de MALT1 facilitaría esta investigación básica y translacional (50).

Factores de transcripción responsables de la diferenciación plasmática: PRDM1/BLIMP1

La proteína PRDM1 (*Positive Regulatory DoMain-containing protein-1*), también denominada BLIMP1 (*B-Lymphocyte Induce Maturation Protein-1*) en ratón, pertenece a la familia de represores transcripcionales con dominio PR. Se encuentra en el locus 6q21, que se encuentra frecuentemente delecionado en linfomas. Presenta la capacidad de reclutar co-represores de la familia Groucho y modificadores de la cromatina (por ejemplo: lisina metiltransferasa [G9a], arginina metil transferasa [PRMT5], histonas deacetilasas 1 y 2 [HDAC1/2] y demetilasa específica de lisina [LSD1]). Estas interacciones promueven el silenciamiento de sus genes diana mediante diferentes mecanismos, dependiendo del contexto (54).

PRDM1 se expresa tanto en linfocitos B como en linfocitos T. En los linfocitos B juega un papel clave en la regulación de la diferenciación a célula plasmática, ejerciendo represión sobre BCL6 y PAX5 (55, 56). En los linfocitos T, PRDM1 también es un factor crítico para la diferenciación terminal de la mayoría de las células efectoras, tanto en células CD4+ como CD8+ (57)

Para facilitar la nomenclatura, ambas formas, murina y humana, se denominan de aquí en adelante como PRDM1.

PRDM1 presenta dos isoformas, PRDM1 α y PRDM1 β . Ambas isoformas se generan a partir del mismo gen por transcripción alternativa dependiendo del promotor utilizado. PRDM1 β difiere de PRDM1 α en que pierde 101 aminoácidos de la zona amino terminal, provocando un dominio PR alterado, causante de la pérdida de su función represora en múltiples genes diana (58).

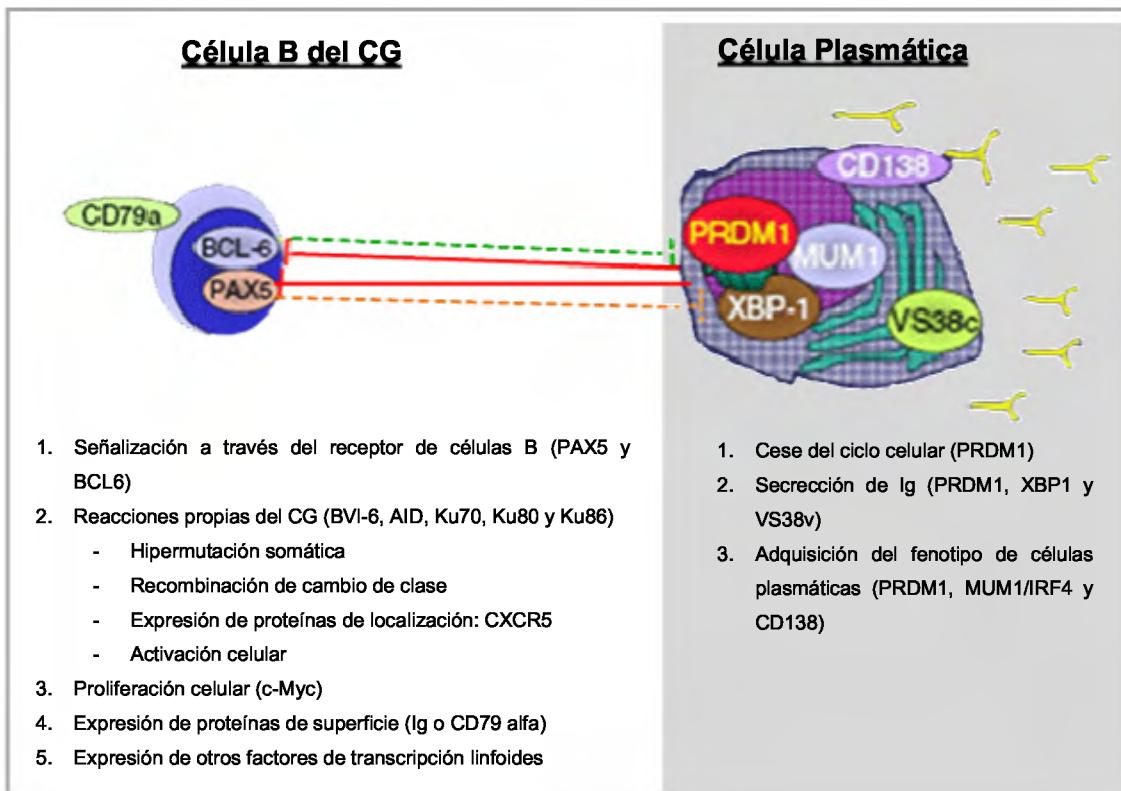
PRDM1 es capaz de provocar que las células B del CG se transformen en células secretoras de anticuerpos y adquieran un fenotipo de célula plasmática (55, 56, 59). Por el momento, sólo se han descrito cinco genes reprimidos directamente por PRDM1:

- *c-myc*, que provoca que se inhiba la proliferación de los linfocitos B (60);
- *CIITA promoter III*, responsable de la regulación del factor de transcripción CIITA, causante de que se inactive la expresión de genes requeridos para la presentación antigénica vía MHCII (59, 61);
- el gen de la proteína activadora específica de linaje B (*PAX5/BSAP*), crítica en las etapas anteriores del desarrollo de los linfocitos B (62); y
- los genes de las proteínas *Spi-B* y *Id3*, asociadas con la adquisición del fenotipo B y con proliferación (63).

Esta represión por sí sola no permite explicar la entrada en un programa de desarrollo hacia célula plasmática (63). Sin embargo, estudios más recientes de expresión génica con *microarrays* de ADNc han demostrado cómo PRDM1 adicionalmente es capaz de regular de forma indirecta gran parte de los genes expresados por las células plasmáticas cuyas funciones comprenden migración, adherencia o mantenimiento de la homeostasis tras la secreción de anticuerpos (63, 64). Todo ello ha provocado que actualmente se considere a PRDM1, el factor de transcripción principal que gobierna la generación de células plasmáticas y la secreción de Ig (63, 65).

Durante la transición de célula B de CG a célula plasmática existen otros factores de transcripción que juegan un papel fundamental. Las proteínas BCL6 y PAX5/BSAP son esenciales para que en las células B en el CG se lleven a cabo los procesos de maduración de afinidad y de cambio de isotipo de las Ig. Ambas proteínas bloquean la diferenciación plasmática: BCL6 reprime PRDM1 y PAX5/BSAP reprime XBP1, otro factor de transcripción esencial en la diferenciación plasmacítica y que se expresa en etapas posteriores a PRDM1 (65) (Figura 4).

Figura 4: Transición de la célula B del centro germinal (CG) a célula plasmática: principales proteínas implicadas y procesos biológicos característicos.



Las proteínas BCL6 y PAX5/BSAP bloquean la diferenciación plasmática: BCL6 reprime PRDM1 y PAX5/BSAP reprime XBP1, otro factor de transcripción esencial en la diferenciación plasmacítica y que se expresa en etapas posteriores. Figura adaptada de Tam W. Blood. 2006 (66).

Cuando la represión de PRDM1 por BCL6 disminuye, por ejemplo tras comenzar la señalización intracelular a través del receptor de células B, PRDM1 inicia la diferenciación plasmática y asegura que ésta sea irreversible reprimiendo a su vez a *BCL6* y a *PAX5/BSAP*. La inhibición recíproca entre BCL6 y PRDM1 asegura que los estadios de célula B del CG y de célula plasmática sean mutuamente excluyentes. Así, PRDM1 compromete la diferenciación plasmática e inhibe a su vez todas las actividades asociadas a etapas anteriores del desarrollo B (65) (Figura 4).

En las células plasmáticas, PRDM1 junto con otros factores de transcripción como MUM1/IRF4 y XBP1, provocan el cese del ciclo celular y disminuyen la señalización mediada por la vía el receptor de células B y la comunicación con las células T. También inhiben el cambio de isotipo y la hipermutación somática, disminuyen la expresión del receptor de citoquinas de CG CXCR5, e inducen la síntesis y secreción de Ig (65) (Figura 4).

El gen que expresa PRDM1, *BLIMP1*, se encuentra inactivado en una gran variedad de linfomas, incluyendo LDGCB, linfomas de NK y linfoma anaplástico grande de células T (54)

En ratón adulto la expresión de PRDM1 *in vivo* es específica de células plasmáticas, tanto las desarrolladas tras la respuesta inmune primaria como las formadas en una respuesta secundaria a partir de las células de memoria (67). PRDM1 no se ha encontrado en las células B de memoria, aunque si se expresa en un 5-15% de las células B del CG que han adquirido un fenotipo de célula plasmática (67). Este patrón de expresión sugiere que estas células B del CG pueden estar comprometidas para su diferenciación plasmacítica y que los niveles de PRDM1 pueden determinar que se diferencien a células plasmáticas capaces de secretar Ig o que se conviertan en células B de memoria (67).

En humanos, los estudios de expresión de PRDM1 son muy escasos al no existir anticuerpos monoclonales de calidad frente a esta proteína. Un estudio reciente destaca la presencia de PRDM1 en las células B del CG comprometidas en su diferenciación plasmática co-expresándose con PAX5, CD19, CD20 y CD10, pero no con BCL6 o MTA-3. PRDM1 se co-expresa igualmente en células plasmáticas CD138+. Las células B extrafoliculares activadas (CD30+, PAX5+) son PRDM1 negativas al igual que la mayoría de las células T, histiocitos y células presentadoras de antígenos S100-positivas (68).

Se ha descrito que la forma corta (PRDM1 β) se encuentra sobre-expresada (niveles elevados de ARNm) en LDGCB; su promotor se encuentra hipometilado en líneas celulares de este tipo de linfoma. También está hipometilado el promotor en las células Hodgkin-Reed-Sternberg (H-RS) de LH. La sobreexpresión de PRDM1 β se ha asociado con la infección del EBV, virus implicado en la patogénesis de varios linfomas derivados de células CG; incluyendo LDGCB y LH. Esta sobreexpresión va acompañada por la hipometilación de su promotor. Adicionalmente la infección con EBV conlleva la reducción de la expresión de PRDM1 α (54).

Tanto en linfomas de células T como de células B se ha relacionado la expresión de PRDM1 β con resistencia *in vitro* a agentes quimioterapéuticos (69)

La escasez de anticuerpos monoclonales capaces de detectar de manera específica PRDM1 en tejido linfoide reactivo (fijado en formol y embebido en parafina) y en neoplasias linfoides, dificulta realizar estudios de expresión durante la diferenciación plasmacítica normal. También impide valorar las posibles alteraciones en la expresión de PRDM1 durante la linfomagénesis.

ANTICUERPOS MONOCLONALES, INMUNOFENOTIPO E IMPLICACIONES EN EL ESTUDIO DE LINFOMAS

Con anterioridad a los años ochenta, los anatomicopatólogos tenían que basarse en la identificación de características morfológicas clásicas para afrontar un reto diagnóstico. El establecimiento en los años setenta de técnicas para la producción de anticuerpos monoclonales representó un gran avance para el estudio de los linfomas (70, 71). Los primeros anticuerpos monoclonales se seleccionaron para reconocer determinantes antígenicos o epítopos superficiales sobre los leucocitos, sin embargo, aunque estos anticuerpos se podían utilizar en secciones de tejido humano congelado, muy pocos reaccionaban en tejido embebido en parafina, por lo que su valor en el diagnóstico patológico era muy limitado.

Los anticuerpos monoclonales que funcionaban en parafina comenzaron a aparecer en los años ochenta. La mayoría reaccionaba con moléculas que no eran específicas de linaje (como, por ejemplo, CD15 o CD43) y no estaba claro que fuera posible producir anticuerpos que sirvieran como marcadores de linaje y que pudieran utilizarse para el estudio de biopsias de forma rutinaria. Una publicación en 1984, donde se caracterizaba un nuevo anticuerpo monoclonal, mostró importantes conclusiones a este respecto (72). El reactivo era el L26, y fue elaborado y seleccionado por su gran especificidad en el reconocimiento de las células B en secciones de tejido. No fue hasta los años noventa cuando se demostró que reaccionaba con un epítopo intracelular de la molécula CD20, una fosfoproteína de membrana de función poco conocida expresada específicamente en los linfocitos B (73). Esta observación mostró las primeras evidencias de cómo un marcador específico de linaje clásico podía ser detectado en rutina diagnóstica por un anticuerpo mediante IHQ. A finales de los años ochenta se produjeron nuevos anticuerpos dirigidos a epítopos intracelulares de la cadena epsilon de la molécula CD3 capaces de reconocer de manera específica los linfocitos T en tejido (74, 75).

Gradualmente han ido apareciendo un gran número de anticuerpos monoclonales frente a moléculas de superficie de los leucocitos, permitiendo fenotipar las diferentes poblaciones linfoides.

Utilizando estos anticuerpos monoclonales en IHQ en tejido incluido en secciones de parafina, se consigue fenotipar los linfomas originados de esas poblaciones de forma muy similar a como puede hacerse en suspensiones celulares. Algunos de estos marcadores representan el trabajo de diferentes laboratorios de inmunología o talleres de trabajo (*Human Leukocyte Differentiation Antigens Workshops*, HLDA) donde se han agrupado aquellos

anticuerpos monoclonales de características similares o idénticas en los llamados “cluster designation” o CDs y que suelen venir definidos por un número (76).

En la actualidad, esta lista de marcadores se ha ampliado con nuevos anticuerpos dirigidos a moléculas intracelulares, lo que ha extendido las posibilidades inmunofenotípicas. Algunos ejemplos de estos marcadores intracelulares con relevancia clínica son: la proteína anti-apoptótica BCL2 o los factores de transcripción BCL6, MUM-1 o PAX5/BSAP (77, 78).

Técnicas de producción de anticuerpos monoclonales: inmunización genética aplicada a la producción de nuevos marcadores linfoides

Con la publicación de una carta breve en 1975 en la revista *Nature* por los profesores Georges Köhler y Cesar Milstein, donde se describía la posibilidad de producir de forma continua líneas celulares capaces de expresar anticuerpos específicos (70), comenzaba el desarrollo de las técnicas de producción de anticuerpos monoclonales. Desde entonces, esta tecnología ha sufrido una rápida y continuada propagación mostrando aplicaciones en todos los aspectos de investigación básica en inmunología, biología celular, bioquímica y medicina. En la actualidad, es una clara promesa en diagnóstico y en terapia tumoral. Por esta aportación a la Ciencia y por la revolución tecnológica que supuso, ambos autores recibieron el Premio Nobel de Medicina en 1984.

Proceso de producción de anticuerpos monoclonales

El proceso de producción de anticuerpos monoclonales es largo y complejo. De forma resumida, el proceso se inicia con la inmunización repetida del animal, normalmente ratón o conejo, con el antígeno hacia el que se desea producir un anticuerpo monoclonal. La inmunización del animal es clave ya que es mediante la que se induce la respuesta inmune humoral. En dicha respuesta, se producen células plasmáticas productoras de anticuerpos específicos frente al antígeno de interés. Si esta fase de inmunización no es óptima, la producción del anticuerpo monoclonal específico sería inviable.

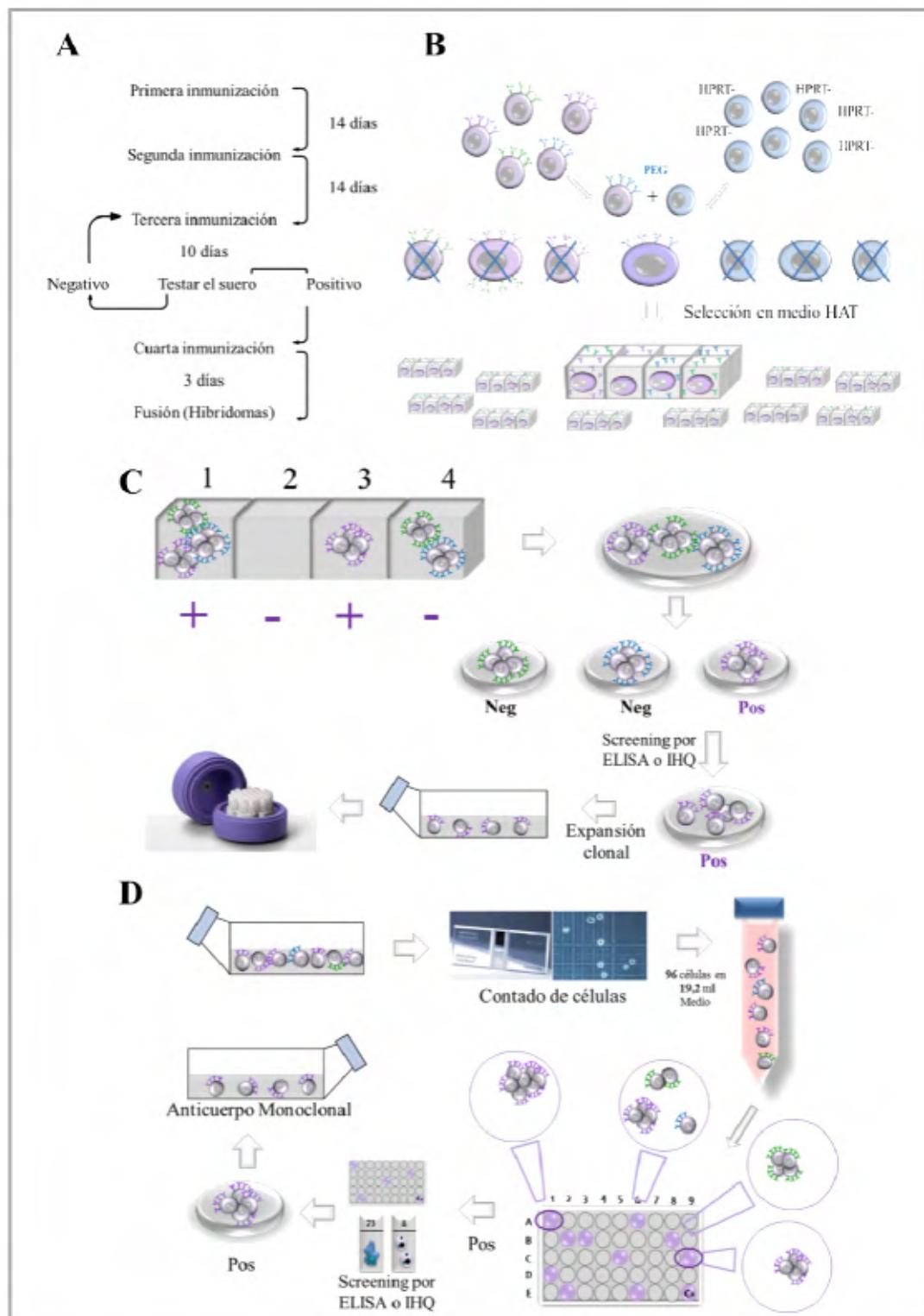
Para asegurar el desarrollo de la respuesta inmune adecuada, se toma sangre del animal en diferentes momentos y se evalúa la presencia en plasma de anticuerpos específicos frente a la proteína de interés (presencia de anticuerpos policlonales frente al antígeno). Una vez detectados anticuerpos específicos frente al antígeno de interés, se extraen las células B del bazo del animal y se fusionan, mediante la adicción de agentes fusiogénicos como el polietilenglicol

(PEG), con células tumorales de mieloma múltiple (MM). Estas células de MM pueden crecer indefinidamente en cultivo celular y provendrán de ratón o de conejo dependiendo del origen de las células B del bazo del animal inmunizado inicialmente. Dado que todos los anticuerpos monoclonales descritos en la presente Tesis Doctoral se produjeron en ratón, de aquí en adelante sólo se hará referencia a las técnicas de producción en este tipo de animales.

Las células fusionadas híbridas, llamadas hibridomas, pueden multiplicarse de forma rápida e indefinidamente y pueden producir gran cantidad de anticuerpos. Estos hibridomas posteriormente son diluidos en medio de cultivo apropiado y cultivados para obtener un número determinado de clones que producen un sólo tipo de anticuerpo.

Finalmente, los anticuerpos de diferentes clones son analizados para conocer su capacidad de unirse al antígeno concreto de interés de forma específica mediante técnicas de cribado o de “screening” como la IHQ o los enzimoinmunoensayos. El análisis permite la selección y el aislamiento de aquellos clones productores de anticuerpos que se unen de forma efectiva y específica al antígeno de interés (Figura 5) (70).

Figura 5: Esquema representativo de las diferentes fases de la producción de anticuerpos monoclonales.



A): Esquema de inmunización. El proceso se inicia con la inmunización del animal en unos períodos de tiempo concretos como se esquematiza. Tras la tercera inmunización se extrae sangre al ratón y se evalúa, mediante IHQ y ELISA, la presencia en suero de anticuerpos específicos frente al antígeno de interés. Si el suero es negativo se procede a una nueva inmunización. Si el suero es positivo se realiza una inmunización final y pasados 4 días, se extrae el bazo del animal para obtener las células B productoras de anticuerpos y realizar la fusión celular.

Figura 5 (cont) B): Fase de fusión y crecimiento de hibridomas. La fusión se realiza en base a un protocolo estricto que emplea polietilenglicol (PEG). Se realiza entre las células B extraídas del ratón y células de MM carentes de la enzima hipoxantinaguaninafosforibosiltransferasa (HPGRT) y por tanto sensibles a un medio selectivo con hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT). Los hibridomas se cultivan en este medio selectivo. En la suspensión celular posterior a la fusión encontramos células de MM sin fusionar y fusiones de mieloma-mieloma, que morirán en el medio selectivo al no tener HPGRT, y linfocitos no fusionados. Estos últimos no ocasionan un gran problema ya que mueren espontáneamente a los pocos días de la fusión. Las células tumorales (MM) fusionadas entre sí y las no fusionadas se multiplican rápidamente, a una tasa igual o mayor que la de los hibridomas productivos y es necesario eliminarlas en el medio selectivo. **C): Fase de screening o cribado.** Después de 7 a 14 días, los hibridomas ya se han multiplicado y formado colonias. El sobrenadante de cada pocillo se vuelve a testar (IHQ y ELISA) para evaluar la presencia de anticuerpos monoclonales específicos para el antígeno de interés y diferenciar los hibridomas de interés. **D): Fase de clonación y selección de los hibridomas de interés.** Durante el período de desarrollo de las colonias es necesario hacer clonaciones con el objetivo de obtener el crecimiento de solo una colonia en cada pocillo de la microplaca de cultivo. Esto se logra mediante el método de dilución escalada. Aquellos pocillos donde crecen colonias individuales se vuelven a testar buscando el clon de hibridomas productor de anticuerpos monoclonales de interés. Aquellos hibridomas que resulten específicos son crecidos *in vitro* para obtener grandes cantidades de anticuerpo.

Aunque la tecnología de producción de anticuerpos monoclonales frente a un antígeno concreto está muy establecida, en la actualidad, existen estrategias alternativas. Las principales variaciones se presentan en el proceso de inmunización del animal.

En los métodos de inmunización convencional se emplea como antígeno una proteína o unos péptidos sobre los que se quiere generar la respuesta inmune. Se requiere por tanto el aislamiento y la purificación de la proteína o péptidos de interés sobre los que se quiere producir el nuevo anticuerpo monoclonal específico. La producción de proteínas recombinantes suele ser costosa, difícil y requerir mucho tiempo (aproximadamente entre 1 y 4 meses), especialmente en el caso de proteínas de membrana, que por lo general son muy difíciles de aislar.

En ocasiones, hay proteínas que no pueden ser aisladas con la suficiente pureza para esta etapa de inmunización, clave en el proceso de producción de anticuerpos monoclonales. En otros casos, el epítopo de interés se pierde o modifica durante el proceso de purificación y aislamiento; en este caso los anticuerpos monoclonales producidos no irán dirigidos al epítopo diana. Alternativamente, se pueden sintetizar péptidos que sustituyan a las proteínas, los cuales exponen un epítopo de tipo lineal. Sin embargo, no todos los péptidos pueden ser sintetizados y, en ocasiones, los que se sintetizan no presentan las modificaciones post-traduccionales con las que se forma el epítopo de interés contra el que se quiere producir el anticuerpo monoclonal. En la mayoría de los casos los péptidos son además poco inmunogénicos y producen una respuesta inmune poco eficiente.

Aplicación de la inmunización genética a la producción de anticuerpos monoclonales

Existe un método alternativo de inmunización del animal, denominado inmunización genética. Este método consiste en generar inmunidad protectora/productora de anticuerpos mediante una transferencia directa de los genes codificantes de las proteínas o péptidos sobre los que se quiere desencadenar la respuesta inmune. Estos genes se incluyen en un vector codificador que permite la expresión de esa proteína o del péptido de interés en las propias células del animal inmunizado.

La inmunización genética tiene una potencial aplicación práctica en la producción de anticuerpos monoclonales al ser considerablemente más rápida y barata que las técnicas convencionales de inmunización. Esto es debido a que se evitan las etapas de producción y de purificación de las proteínas o de los péptidos. Al eliminarse estos obstáculos, no es necesario disponer de la proteína purificada o de los péptidos ni durante la etapa de inmunización ni durante el cribado de los hibridomas. Adicionalmente consigue una activación más eficaz y rápida de los linfocitos B y puede emplearse en una gran variedad de huéspedes (ratón, conejo y humano) (79).

Durante los últimos años, la inmunización genética ha sido usada repetidamente para el desarrollo de vacunas de ADN. Esta técnica produce anticuerpos monoclonales frente a diversos tipos de patógenos y, por tanto, permite potencialmente combatir diversas enfermedades infecciosas emergentes (80). La inmunización genética produce respuestas inmunes celulares y humorales rápidas y efectivas y resuelve los problemas que aparecen con las inmunizaciones convencionales con proteínas y/o con péptidos frente a estos patógenos (80). Sin embargo, no se había investigado la posible aplicación de la inmunización genética para el desarrollo de los anticuerpos monoclonales con fines diagnósticos. Por esa razón, parte de este trabajo de investigación está centrado en la puesta a punto de esta tecnología y en la evaluación de ventajas respecto a las técnicas convencionales de producción.

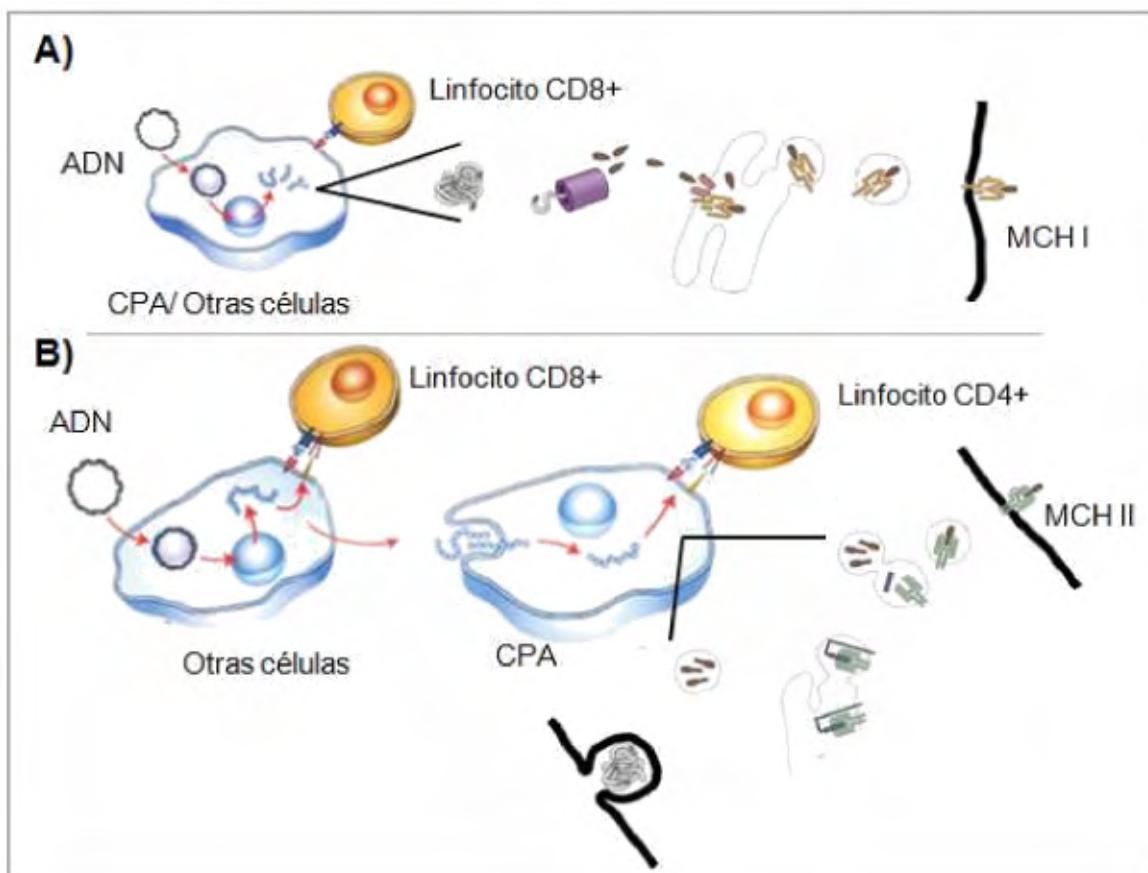
En la inmunización genética, como se ha comentado previamente, el inmunógeno es un vector codificador de una proteína que se introduce en el animal por diferentes metodologías. Las células que han captado el vector e insertado el gen de interés en su genoma, producen *in vivo* la proteína manteniendo las modificaciones post-traducionales adecuadas (Figura 6). El vector es captado por varios tipos de células; sin embargo, para activar a las células del sistema

inmune, tienen que tomarlo las células presentadoras de antígenos (CPA), mayoritariamente las células dendríticas. Las CPA también pueden adquirir el antígeno de otras células mediante presentación cruzada (o fagocitosis) de otras células que hayan incorporado el vector, especialmente queratinocitos.

Las proteínas sintetizadas son degradadas en el interior celular (vía proteasoma) y los péptidos resultantes se unen al complejo mayor de histocompatibilidad tipo I (MCH-I) en el retículo endoplásmico. Las proteínas captadas mediante la presentación cruzada se unen al MCH-II. Los péptidos unidos a los diferentes MCH, I y II en las CPA, alcanzan la superficie celular, donde serán reconocidos por los receptores de los linfocitos T (citotóxicos [CD8+] o helper/colaboradores [CD4+], respectivamente) en los ganglios linfoides (Figura 6).

Este reconocimiento, junto con la interacción de los linfocitos con moléculas coestimuladoras expresadas en las CPA (que migran hacia los ganglios linfoides), conlleva la activación y proliferación de los linfocitos T. Por otro lado, en los ganglios linfáticos, los linfocitos B, mediante sus receptores BCR, reconocen las proteínas que presentan en la superficie las CPA o que quedan solubles tras la apoptosis o lisis de las mismas. Este reconocimiento, junto con la estimulación que reciben de los linfocitos T colaboradores activados que promueve la expresión de moléculas coestimuladoras, conlleva a la activación de los linfocitos B. Tras esta activación, los linfocitos B cambian de isotipo (Ig) y se diferencian a células memoria o células plasmáticas que producen y secretan anticuerpos contra el epítopo de la proteína o del péptido codificado en el vector inoculado en el animal.

Figura 6: Mecanismo biológico de presentación del antígeno tras la inmunización genética



A: Tras la inmunización genética, las células (CPA u otras células) que han incorporado el vector sintetizan la proteína y tras su degradación alcanza la membrana mediante la unión al MCH I. B: Las CPA pueden fagocitar los fragmentos proteicos sintetizados por otras células y en este caso alcanza la membrana celular mediante la unión al MCH II (presentación cruzada). Los péptidos presentados por el MCH I serán reconocidos por los linfocitos CD8+, y aquellos presentados por el MCH II, por los linfocitos T CD4+. Figura adaptada de: Abbas et al_2004 (81) y Hasson et al_2015 (82)

Los principales factores que hay que tener en cuenta para el éxito de la inmunización genética son: el diseño de los inmunógenos, los métodos de inmunización genética empleados, los esquemas de inmunización y cómo se realiza la inmunización final del animal previa a la extracción de las células B del bazo (79, 83-85).

Durante los últimos años, el diseño de vectores de expresión eucariota que pueden utilizarse en la inmunización genética se ha optimizado significativamente. Parece claro que la región promotora de estos vectores de ADN juega un rol muy importante. En la inmunización con ADN, el promotor del citomegalovirus (CMV) es un elemento esencial que permite la expresión génica de la secuencia codificante en las células eucariotas; el vector más ampliamente utilizado para incorporar la secuencia codificante es el pc-DNA3 (79).

Desde sus comienzos, en la inmunización genética se ha empleado una amplia gama de metodologías inmunización, sin embargo, todos los enfoques pueden dividirse en dos grandes categorías. La primera categoría se basa en una sencilla inyección con una aguja tradicional; las diversas soluciones empleadas para disolver los plásmidos de ADN aumentan la eficiencia de la captación del plásmido de ADN por las células. La segunda categoría, a diferencia de la anterior, está basada en fuerzas físicas; el enfoque más representativo es el que recurre a una pistola de genes (*Gene Gun*) que utiliza una fuerza "balística" para introducir los plásmidos de ADN en el interior de las células. Otras inmunizaciones menos comunes son las realizadas intraperitoneal o intraesplénicamente, ya sea por inyección clásica o por *Gene Gun* (83-85). En la Tabla 5 se resumen diferentes metodologías de inmunización genética utilizadas para la producción de anticuerpos monoclonales.

Tabla 5: Tipos de inmunización genética utilizados para producir anticuerpos monoclonales

<i>Metodología</i>	<i>Tipos de proteína</i>
<i>Gene Gun</i>	De transmembrana simple (Fit-3R, CAR, MICA) De transmembrana doble (P2X7) Intracelular (PED/PEA-15; anexina-V, BCL6 , MALT1) Lipoproteínas de parásitos De cubierta viral (VIH gp120) Enzima con anclaje GPI
<i>Intramuscular</i>	Toxina bacteriana (Heicobacter pilori) Receptores acoplados a proteínas G con 7 dominios transmembrana (TSHR) Viral de cubierta (VHG E2, H5N1) Viral de superficie (VHB preS2/S) Viral no estructural (Dengue, NS1) Secretora (enzima: APS; citoquina: Interferón β , CKLF1)
<i>Intradérmica</i>	De transmembrana simple (RET, CD2,CD30) Glicoproteína (plasma y matriz extracelular) (Fibulina-1)
<i>Intramuscular seguida de electroporación</i>	Receptores acoplados a proteínas G con 7 dominios transmembrana (CCX-CKR) De cubierta viral (H5N1, H1) Secretoras (mCherry) Toxina bacteriana (toxina A, <i>C. difficile</i>)
<i>Intradérmica seguida de electroporación</i>	Dianas múltiples (transmembrana, intracelular)

Adaptada de: Liu et al_ 2016 (79) Abreviaturas: APS: Antígeno específico de próstata; BCL6: *B-cell lymphoma 6 protein*;CAR: *Coxsackie Adenovirus Receptor*; CD2: *cluster de diferenciación 2*; CD30: *cluster de diferenciación 30*, CKLF1: *chemokine-like factor 1*; Fit-3R; *fetal liver tyrosine kinase 3 receptor*, GPI: *glicosilfosfatidilinositol*; MALT1: *mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1*; MICA: *MHC-I-related gene A*; P2X7: *P2X purinoceptor 7*; PED/PEA-15: *phosphoprotein over expressed in diabetes/phosphoprotein enriched in astrocytes*; RET: *rearranged during transfection*; TSHR: receptor de la hormona estimulante del tiroides; VHB: virus de la hepatitis B; VHG: virus de la hepatitis G.

A continuación se revisan los principales métodos de inmunización genética: inyección (intradérmica y/o intramuscular) con o sin electroporación tras la inyección, transferencia génica hidrodinámica y la transferencia génica balística (o *Gene Gun*) (79).

El método más sencillo es la inyección tradicional, que consiste en inyectar directamente en el tejido del animal el vector con el ADN codificante para la proteína/péptido de interés. La inyección puede ser intramuscular o intradérmica:

- En la inyección intramuscular, el plásmido es inyectado en los músculos del animal, normalmente en las patas traseras del ratón. El daño por la inyección promueve el reclutamiento directo de células dendríticas al músculo, que incorporan los péptidos o las proteínas secretadas por los miocitos que han captado el vector. Las células dendríticas migran del músculo al ganglio linfoide donde se produce la activación, proliferación y diferenciación del linfocito B maduro (86).
- En la inyección intradérmica, el plásmido es inyectado en la dermis, normalmente en la zona del vientre del ratón. Allí es incorporado por las células cutáneas y las células dendríticas que residen en la dermis, expresando el antígeno codificado por el vector. La irritación local que produce la inyección promueve igualmente la migración de las células dendríticas a los ganglios linfoides donde se produce la activación, proliferación y diferenciación del linfocito B maduro (87).

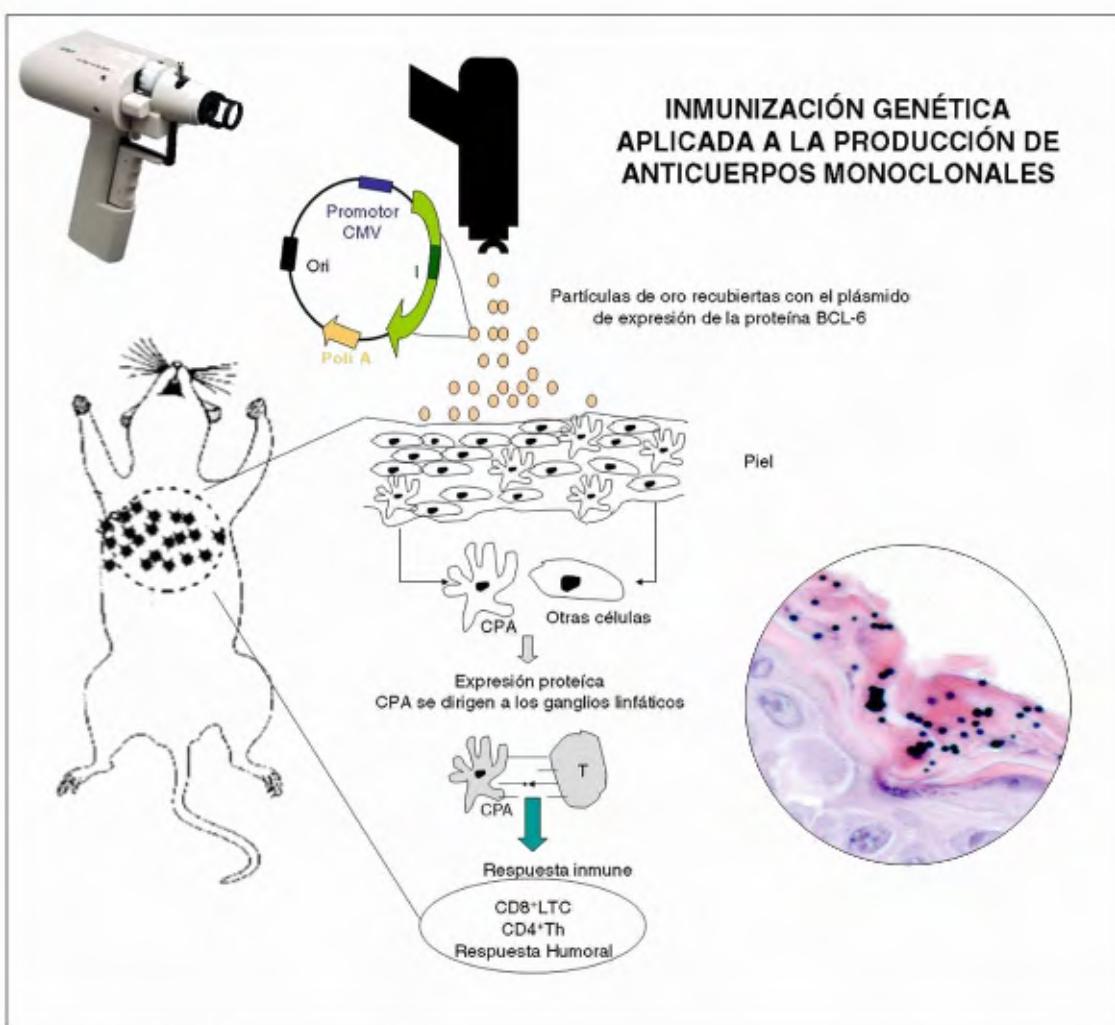
La eficiencia de transferencia de la inyección puede verse incrementada mediante el uso de la electroporación, es decir, la administración de pulsos eléctricos de alto voltaje que aumenta la permeabilidad de la membrana celular. Se producen poros transitorios en la membrana celular que permiten la entrada del vector inyectado al interior celular (79) (83-85).

En la transferencia génica hidrodinámica, un nuevo procedimiento, el vector se diluye en una solución salina acuosa isotónica y se inyecta de forma intravenosa. El vector es incorporado a las células por la modificación hemodinámica.

En la transferencia génica balística (*Gen Gun*), el vector de expresión que codifica la proteína (o el fragmento proteico) de interés se introduce en el animal utilizando una pistola de helio “*Gene Gun*” (Figura 7). El vector de interés se sitúa recubriendo micropartículas de oro que son disparadas en la piel del animal, normalmente en la piel abdominal una vez afeitada cuidadosamente la zona (83-85). Este tipo de inmunización genética puede realizarse mediante equipos comerciales, por ejemplo *Helio-Gene Gun* (BioRad Laboratorios, Hercules, California).

El proceso es sencillo, el plásmido de ADN purificado se precipita por cloruro cálcico en partículas de oro, normalmente de 1 μm de diámetro, en un medio con espermidina siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Los cartuchos de 5 μg de ADN por disparo, se pueden almacenar en seco, a 4° C, en oscuridad y con partículas antihumedad. En cada ronda de inmunización, los ratones deben anestesiarse con gas isofluorano para afeitar el pelo de la parte abdominal. El *Gene-Gun* propulsa por helio a una presión de 400 psi (2758 kPa) para liberar un disparo en la epidermis de la zona inguino-abdominal del ratón. No deben observarse lesiones o daños en el ratón tras ninguna de las inmunizaciones.

Figura 7: Esquema de la producción de anticuerpos monoclonales por inmunización genética vía *Gene Gun*.



El vector de interés se sitúa recubriendo las micropartículas de oro que son disparadas en la piel del animal. Observe la disposición de las partículas en la epidermis. Abreviaturas: CMV: promotor de citomegalovirus, I: intrón, CPA: células presentadoras de antígenos, LTC: linfocitos T citotóxicos, Th: células T colaboradoras o *helper*. Esquema adaptado de las revisiones (83-85)

Otro de los factores críticos en la inmunización genética es el esquema de inmunización. En la literatura clásica se contempla que, para la inducción de anticuerpos monoclonales de alta calidad mediante inmunización genética, la inmunización implicaría un período de tiempo prolongado, con largos intervalos de descanso. Este esquema puede ser más eficaz para obtener respuestas de anticuerpos de alta calidad si se compara con esquemas de inmunizaciones sucesivas y rápidas. Sin embargo, en la mayoría de los estudios en animales, para la generación de anticuerpos monoclonales se requieren inmunizaciones múltiples, usualmente cada 2-3 semanas (79).

Por último, es necesario destacar que para la producción de anticuerpos monoclonales se requiere la disponibilidad de muchas células B activadas específicas del antígeno en los órganos linfoides (bazo). Estas células son clave para la fase final de fusión y generación de los hibridomas productores de anticuerpos.

En los métodos tradicionales de inmunización proteica, se consigue aumentar el número de células B activadas en bazo mediante una inmunización final (inyección intravenosa o intraperitoneal), 3-5 días antes de la fusión. También es necesaria la inmunización genética final para la inmunización con ADN, siendo uno de los factores más importantes para garantizar la producción de un elevado número de anticuerpos específicos.

Se ha demostrado que, si únicamente se realiza una inmunización genética final, la eficiencia en la generación de hibridomas positivos es baja (79). Este problema se ha solventado con una última inmunización con un refuerzo con antígenos. Esta puede realizarse con la proteína diana, con los péptidos de interés, o con las células transfectadas con el plásmido que expresa la proteína/péptidos de interés. Gracias a este refuerzo, se generan títulos mucho mayores en el animal inmunizado, mejorándose la generación de hibridomas productores del anticuerpo de interés (79) (88-90). En la Tabla 6 se resumen las principales opciones de inmunización final del animal.

Tabla 6: Opciones de inmuniación final del animal.

<i>Metodología</i>	<i>Tipos de proteína</i>
ADN por IM o ID	Cualquier tipo
ADN por transferencia génica hidrodinámica	Cualquier tipo
Proteína	Secretora Intracelular Transmembrana simple/con anclaje GPI
Células que expresan el inmunógeno	Transmembrana
Partícula viral	Intracelular Viral de superficie

Adaptada de: Liu et al_2016 (79). Abreviatura: GPI: glicosilfosfatidilinositol. IM: intramuscular, ID: intradérmica.

A modo de resumen, en la Tabla 7 se describen las principales características y beneficios de la inmunización genética para la producción de anticuerpos.

Tabla 7: Características y beneficios de la inmunización genética aplicada a la producción de anticuerpos.

- **Aplicable en la producción de anticuerpos monoclonales y policlonales.**
- **Desarrollo de anticuerpos de forma rápida:**
Es una producción de los anticuerpos directamente desde la secuencia del ADN, por lo que se eliminan las etapas de síntesis y purificación de proteínas o péptidos.
- **Desarrollo de anticuerpos de forma más económica:**
Al no necesitar la síntesis y purificación de proteínas o péptidos para la inmunización, se reducen los costes en la producción de los anticuerpos. Adicionalmente, las condiciones de almacenamiento y transporte de los vectores (ADN) implican costes menores frente a las requeridas por los péptidos y/o proteínas.
- **Diana antigénica conocida frente a la proteína nativa:**
Los anticuerpos producidos se dirigen hacia la proteína nativa codificada en el vector de expresión. No aparecen por tanto anticuerpos contaminantes con una especificidad errónea que aparecen en las preparaciones de proteínas purificadas. Dado que la proteína se genera en el animal inmunizado, se utiliza su complejo mecanismo celular de producción de proteínas y la proteína adquiere una conformación nativa
- **Diseño del antígeno conocido:**
Los plásmidos de ADN son fáciles de manipular, lo que permite generar anticuerpos que reconozcan regiones concretas de la proteína, como dominios funcionales o activos de la proteína diana. A modo de ejemplo, se puede diseñar vectores de expresión que introduzcan mutaciones en la secuencia del ADN o variaciones alélicas.

- **Anticuerpos de gran afinidad:**
Debido a las bajas cantidades de proteína que se generan en la inmunización genética y a que su producción es lenta y constante, se produce una respuesta inmune que favorece la generación de anticuerpos de gran afinidad. El ADN del plásmido actúa además como un adyuvante para estimular la respuesta inmune
- **Anticuerpos con múltiples aplicaciones:**
Los anticuerpos producidos por inmunización genética reconocen la proteína nativa, por lo que pueden ser utilizados en múltiples aplicaciones, incluyendo: WB, IHQ en congelado y parafina, citometría de flujo, ELISA, arrays de anticuerpos o terapia
- **Procesamiento en paralelo:**
Permite la generación de anticuerpos en paralelo en un mismo ciclo de inmunizaciones, lo que permite eliminar costes

Adaptado de las publicaciones revisadas (77, 82, 88, 91-96)

Todos estos beneficios de la inmunización genética y los múltiples factores que permiten optimizarla abren nuevas vías para incrementar su eficiencia en la generación de hibridomas. Adicionalmente favorecen su aplicación rutinaria en la producción de anticuerpos monoclonales de calidad. En la actualidad, la inmunización genética ha demostrado ser una metodología alternativa prometedora tanto para la producción de anticuerpos policlonales (91) como monoclonales (89, 90, 92, 95). Sin embargo, no se ha utilizado para la generación de anticuerpos monoclonales que puedan ser utilizados en IHQ en secciones de tejido como marcadores inmunofenotípicos con aplicaciones diagnósticas (89, 90, 92, 95). Mediante esta tecnología es posible pasar del gen al anticuerpo, por lo que permite una aplicación rápida de la investigación genómica en la generación de anticuerpos monoclonales.

Aplicación de los nuevos anticuerpos en el estudio de los linfomas humanos: inmunohistoquímica e inmunofluorescencia, líneas celulares derivadas de linfomas humanos y tissue-microarrays

Los métodos de IHQ empleados de forma rutinaria en los laboratorios de patología han mejorado sustancialmente en los últimos años gracias al desarrollo de nuevos métodos de desenmascaramiento antigénico con calor y a la mejora en los sistemas de amplificación e inmunodetección. La disponibilidad y la caracterización de nuevos anticuerpos de elevada sensibilidad y especificidad frente a proteínas de interés (por ejemplo BCL6, MALT1 y PRDM1/BLIMP1) y su potencial aplicación en IHQ sobre tejido fijado en formol e incluido en parafina, les convierte en herramientas que potencialmente pueden mejorar la clasificación de los procesos linfoproliferativos y/o establecer nuevos subtipos con un comportamiento clínico y biológico característico.

En estudios de co-expresión se pueden utilizar estos nuevos anticuerpos junto con otros marcadores inmunofenotípicos de diferentes tipos celulares (normales y/o tumorales). Todo ello es posible gracias al desarrollo de técnicas de doble inmunomarcaje cromogénico o a la disponibilidad de diferentes fluorocromos que permiten el marcaje múltiple mediante inmunofluorescencia indirecta empleando anticuerpos secundarios específicos. El nivel de detalle y la resolución obtenida en estas técnicas de doble marcaje puede asimismo verse sustancialmente mejorada mediante el uso de sistemas de elevada resolución como la microscopía confocal.

La validación de los nuevos anticuerpos monoclonales para la detección de proteínas de interés en las diferentes poblaciones linfoides se suele realizar inicialmente empleando líneas celulares derivadas de diferentes alteraciones linfoproliferativas. En estas líneas celulares, los sistemas de regulación suelen verse alterados, y pueden reflejar alteraciones no existentes en los tumores primarios de los que estas líneas derivan. Sin embargo, y pese a sus limitaciones, su uso nos permite validar los nuevos marcadores inmunofenotípicos y estudiar y caracterizar cómo es la expresión de la proteína reconocida por estos anticuerpos. De forma similar, para esta validación también es muy interesante caracterizar la expresión en tejido linfoide normal reactivo (normalmente, amígdala, bazo o apéndice) donde la expresión inmunofenotípica de otros marcadores en las diferentes poblaciones linfocitarias está ya descrita y es conocida. Tengamos en cuenta, como se ha explicado previamente, que en la mayoría de las entidades neoplásicas, es posible hallar una explicación plausible a los hallazgos inmunofenotípicos atendiendo a las características de las células linfoides que corresponden a su contrapartida normal.

Por último, para el análisis y la caracterización de los nuevos marcadores en tejidos normales y tumorales, se requiere:

- el estudio simultáneo de un gran número de otras moléculas relacionadas con la diferenciación celular, el ciclo celular y la apoptosis; y
- un elevado número de tumores primarios para realizar estudios en largas series de pacientes.

Para realizar dichos análisis en múltiples tejidos (normales y tumorales), simultáneamente con otros marcadores, y determinar los niveles de expresión de diferentes estas proteínas mediante IHQ, actualmente existen las técnicas de análisis masivo de expresión de biomarcadores, como son por ejemplo las matrices tisulares o los *Tissue-MicroArrays* (TMAs) (97) (98, 99).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Existe en la actualidad una necesidad creciente de identificar nuevos marcadores útiles para comprender la biología de las neoplasias linfoides y que puedan tener un valor pronóstico/clínico en pacientes. Los anticuerpos monoclonales se han convertido en las últimas décadas en una poderosa herramienta para la identificación de marcadores específicos en muestras de tejido parafinado. Representan un valioso instrumento para el diagnóstico y pronóstico de las neoplasias linfoides, lo que está facilitando el progreso hacia una medicina personalizada de precisión.

La hipótesis global de esta investigación es que la generación y caracterización de anticuerpos monoclonales frente a las proteínas BCL6, MALT1 y PRDM1 puede permitir esclarecer el papel que juegan estas proteínas en el desarrollo de los linfocitos reactivos y los linfomas. Al mismo tiempo, en este estudio se investiga la posible aplicación diagnóstica de estos marcadores.

A su vez, parte de esta Tesis Doctoral se basa en el desarrollo y puesta a punto de la técnica de inmunización genética como alternativa que permitiría facilitar la producción de anticuerpos monoclonales específicos con utilidad como herramientas para la investigación y el diagnóstico de neoplasias linfoides.

Para la evaluación de estas hipótesis se han marcado una serie de objetivos:

1. Evaluación de la inmunización genética como un método alternativo, efectivo y viable para la producción de anticuerpos monoclonales frente a proteínas con interés diagnóstico.
2. Caracterización y validación de los anticuerpos anti-BCL6 producidos por inmunización genética y por inmunización convencional.
3. Caracterización y evaluación de las aplicaciones de un nuevo anticuerpo monoclonal anti-MALT1 producido por inmunización genética.
4. Estudio del patrón de expresión de PRDM1 en tejido linfoide reactivo y evaluación de su potencial utilidad como marcador inmunofenotípico de células plasmáticas.

5. Estudio de la expresión de PRDM1 en una serie de linfomas para determinar su posible uso como marcador diagnóstico.
6. Evaluación de la relación entre la expresión de PRDM1 y la conducta clínica de los pacientes con LDCBG.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

LÍNEAS CELULARES

En los diferentes estudios realizados se han empleado un total de 26 líneas celulares.

Las líneas celulares: Toledo (derivada de LDCBG), Ramos (derivada de linfoma de Burkitt) y HEK-293T (derivada de células de riñón embrionario humano) se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Celulares (ATCC, Rockville, MD, <http://www.lgcromochem-atcc.com/>).

Las líneas celulares humanas derivadas de células de LDCBG (KARPAS-422 y DB), de leucemia linfoblástica aguda (REH), de mieloma múltiple (U-266, RPM1-8226, L363, SKMM2, KARPAS-620, NCL-H929, JJN-3, OPM2, LP1), de linfomas B (RC-K8, SU-DHL-5, SUDHL-8, DB, DOHH2, KARPAS 422), de leucemia de precursores B 380, de leucemia B (KARPAS 231), y de linfoma de Burkitt (Raji) así como la línea celular murina Ba/F3 (célula pro-B) se encuentran disponibles en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DSMZ, Braunschweig, Alemania).

Las líneas celulares derivadas de linfomas de Burkitt: Mutu-1(100) y AKATA(101) fueron cedidas por el Dr. Miguel Campanero del Centro Nacional de Investigaciones Biológicas, Madrid, España.

Las líneas celulares humanas de LDGCB (SSK41) y de linfoma B (MD90, RIVA) fueron cedidas por el Dr. Martin J. Dyer (Leicester, Reino Unido).

Las diferentes líneas celulares se crecieron a 37º C en una atmósfera de 5% de CO₂ y 98% de humedad, en medio RPMI-1640 (Invitrogen) suplementado con glutamina, penicilina, estreptomicina y suero bovino fetal australiano al 10% (Life Technologies Inc., Estados Unidos) inactivado previamente por calor. El medio fue suplementado con interleuquina-6 (20 ng/ml, PeproTech, Londres, Reino Unido) para el cultivo de las líneas celulares KARPAS-620 y NCI-H929.

Para preservar las líneas celulares se utilizó el mismo suero bovino fetal al 10% con dimetilsulfóxido (DMSO) congelado en nitrógeno líquido. Para el cultivo y preservación de las

Líneas celulares se utilizaron los equipos de cultivos y de criopreservación del Programa de Biotecnología del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO).

RATONES BALB/c

Para la producción de anticuerpos monoclonales se utilizaron ratones de la cepa BALB/c que se obtuvieron originalmente de los laboratorios Charles River y se mantuvieron posteriormente en condiciones libres de patógenos en la Unidad del Animalario del CNIO.

Todos los experimentos fueron realizados bajo un protocolo experimental aprobado por el “*Institutional Committee for Care and Use of Animals, CEUCA no. 001/02*”.

MUESTRAS DE TEJIDO Y MATRICES DE TEJIDOS

El Banco de Tumores del CNIO coordinó la obtención, conservación e identificación de las muestras de tejido recibidas por nuestro grupo. Las muestras de tejido se obtuvieron de la Red de Bancos de Tumores del CNIO con los consentimientos informados de todos los pacientes y bajo la supervisión del Comité Ético local.

En un intento de aplicar criterios homogéneos en la descripción de los tumores, todos los casos fueron revisados por al menos dos de los siguientes patólogos: Dr. Miguel Á. Piris (CNIO), Dr. Juan Fernando García (MD Anderson, Madrid, España), Dra. Teresa Marafioti y Profesor Dr. David Y. Mason (John Radcliff Hospital, Oxford, Reino Unido).

El diagnóstico se realizó siguiendo los criterios de la clasificación presentada por la OMS del 2001 basándose en las características clínicas, histológicas e inmunofenotípicas y en los estudios moleculares de los tumores.

Las muestras se fijaron rutinariamente en formol tamponado normal 10% (Panreac, Barcelona, España) durante 24 horas y se incluyeron en parafina utilizando técnicas convencionales. En los estudios en los que se utilizaron muestras de tejido congelado, las biopsias se incluyeron en OCT (Sakura Finetek Tissue-Tek O.C.T., Olympus, España), compuesto utilizado para conservar y mantener los bloques de tejidos congelados.

Para los diferentes estudios se seleccionaron un total de 792 casos de linfomas, Hodgkin y no Hodgkin, junto con un total de 7 muestras no tumorales (tejido linfoide reactivo). Todas las biopsias tumorales se obtuvieron previamente al tratamiento de la enfermedad.

Biopsias completas

Para la caracterización de los anticuerpos anti-BCL6 se utilizaron 5 muestras no tumorales correspondientes a amígdalas reactivas. En el estudio del efecto de la fijación en la calidad de la IHQ frente a la proteína BCL6, se utilizaron 2 amígdalas reactivas normales que se cortaron en 5 piezas. Cuatro de las piezas se fijaron en formol tamponado normal 10% durante diferentes tiempos (12, 24 y 48 horas y 1 semana, respectivamente), mientras que la última pieza se fijó durante 1 hora en el fijador B5 (Panreac). Todas estas muestras se procesaron convencionalmente y se incluyeron en parafina.

Para los estudios de expresión de PRDM1 por IHQ simple o combinada con otros marcadores por doble inmunofluorescencia y doble inmunofluorescencia combinada con IHQ, se utilizaron 2 amígdalas reactivas normales y una serie de linfomas B y T.

Preparación de matrices de tejidos

Los diferentes *Tissue Micro-Arrays* o matrices de tejidos se construyeron utilizando el equipo *Tissue Arrayer* (Beecher Instrument; Sun Prairie, Estados Unidos) siguiendo la técnica descrita (97, 98).

Este procedimiento consiste básicamente en disponer, en un único bloque de parafina y en posiciones conocidas, múltiples cilindros representativos de las muestras a analizar de pequeños diámetros (usualmente 0,6-1 mm). De este modo, en una única sección podemos estudiar cientos de tumores de modo simultáneo.

Los casos utilizados se revisaron histológicamente antes de su uso para detectar áreas ricas en células tumorales, marcando la zona tumoral en el bloque de parafina. Posteriormente, se tomaron dos cilindros de la zona seleccionada de cada bloque tumoral y se incluyeron en un bloque receptor. De esta forma, se construyeron diferentes matrices de contenido cada una de ellas cilindros que representaban por duplicado las muestras de los casos de linfomas incluidos en estos estudios. Como controles, en cada matriz de tejidos se incluyeron cilindros representativos de diferentes tejidos linfoides reactivos y de otros procesos linfoproliferativos

comunes (LLC-B/SLLs, linfomas foliculares, linfomas de células del manto, LDCBGs, linfomas linfoblásticos, linfomas T periféricos y linfomas anaplásicos).

La reproducibilidad de todos los resultados obtenidos mediante este análisis de matrices de tejido se validó comparando dichos resultados con los obtenidos en una serie corta de muestras normales y tumorales en la que fueron analizadas secciones completas de tejido que se procesaron de forma similar.

Análisis de la expresión de proteínas en matrices de tejidos

Para la caracterización de los anticuerpos anti-BCL6 se utilizaron matrices de tejidos con 89 biopsias de LDCBG y 24 de LLC-B/SLL. Todas las muestras de LLC-B/SLL correspondieron a nódulos linfoides tumorales con LLC-B o linfoma de linfocitos pequeños.

Para la caracterización de PRDM1 se utilizó una matriz de tejidos normales compuesto por: amígdala, nódulos linfoides con hiperplasia folicular, timo fetal, timo normal, cerebro, laringe, tiroides, vejiga urinaria, hígado, pulmón, piel, músculo esquelético, riñón, páncreas, estómago, duodeno, apéndice, intestino delgado y grueso, ovario, útero, mama, placenta, próstata y testículo.

La expresión de PRDM1, se estudió en diferentes matrices de tejidos que incluían un total de 679 linfomas. Entre los tumores de células B se incluyeron: 250 casos de LDCBG, 22 linfomas de Hodgkin clásico, 115 linfomas foliculares, 54 LLC-B/SLL, 52 linfomas de células del manto, 21 linfomas de Burkitt, 14 linfomas marginales (incluyendo casos esplénicos, nodales y extranodales), 3 linfomas linfoblásticos, 3 linfomas linfoplasmocíticos y 16 mielomas y plasmocitomas. En el grupo de LDCBG, se incluyeron un total de: 19 casos de variante plasmablástica, caracterizados por presentar una localización típica en la cavidad oral y ser casos VIH y EBER positivos; y 8 casos de LDCBG con morfología plasmablástica, donde un 90% de las células tumorales son inmunoblastos con diferenciación plasmocitoide.

Por su parte, PRDM1 se estudió en matrices de tumores de células T con: 41 casos con linfoma T periférico NOS, 30 linfomas anaplásicos de célula grande, 8 micosis fungoides/síndrome de Sézary, 16 linfomas o leucemias linfoblásticas, 4 linfomas T enteropálicos, 18 linfomas T angioinmunoblásticos y 12 linfomas T tipo *Natural Killer* o nasales.

PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

La producción de anticuerpos monoclonales se divide en diferentes etapas. Brevemente, la primera etapa es una inmunización repetida de los ratones con el antígeno hacia el que se quiere producir el anticuerpo monoclonal de interés, posteriormente se extrae el bazo de los ratones inmunizados y se fusionan los esplenocitos con células de mieloma múltiple, NS-1, para la producción de hibridomas. Tras el cultivo y selección de estos hibridomas, se realiza una clonación y re-selección del clon de hibridomas de interés. Finalmente, aquellos hibridomas que producen en el sobrenadante el anticuerpo de interés, se congelan para su conservación, lo que permitirá la producción del anticuerpo monoclonal de forma continua para su caracterización.

Métodos de inmunización convencionales

Expresión en bacterias de proteínas de fusión unidas a GST

El ADNc de la región completa de la proteína PRDM1 fue cedido por el Dr. Tom Maniatis (Universidad de Harvard, Cambridge, Estados Unidos).

El gen PRDM1 fue amplificado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) e introducido en el vector de expresión pDEST15 (Invitrogen, Carlsbad, Estados Unidos) gracias a la tecnología Gateway®, siguiendo las instrucciones del fabricante.

La proteína de fusión GST-PRDM1 se expresó individualmente en *Escherichia coli* cadena BL21 (DE3) y se purificó por cromatografía de afinidad en columnas GSTrap™ (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

El mismo procedimiento se realizó para la producción del anticuerpo monoclonal anti-BCL6 producido por inmunización convencional.

Inmunización convencional con proteínas de fusión unidas a GST

Para la producción del anticuerpo monoclonal PRDM1 se utilizaron proteínas de fusión GST-PRDM1. Se realizaron tres inmunizaciones de 100 µg de la proteína diluida en tampón salino y adyuvante de Freund mediante inyección intraperitoneal en tres ratones BALB/c en un intervalo de tiempo de 14 días. Tras las inmunizaciones no se observaron ni lesiones ni daños en ninguno de los ratones.

Se recolectaron muestras de suero por punción del plexo retro-orbital 40 días después de la primera inmunización. El suero de los ratones se testó por IHQ en muestras de amígdala en congelado para detectar la presencia en él de anticuerpos frente al antígeno de interés, PRDM1; todos los ratones de cada grupo mostraron una respuesta inmune específica frente a esta proteína.

La inmunización final se realizó inyectando intraperitonealmente 150 µg de la proteína GST- diluida en tampón salino en aquel ratón cuya respuesta inmune era más intensa (mayor titulación del suero frente a la proteína de interés). Transcurridos tres días, se sacrificó este ratón para realizar la fusión celular y la producción de los hibridomas.

El mismo procedimiento se realizó para la producción del anticuerpo monoclonal anti-BCL6 producido por inmunización convencional.

Inmunización y producción de anticuerpos monoclonales anti-MALT1 y anti-BCL6 por inmunización genética vía Gene-Gun

Plásmidos de ADN de expresión en células eucariotas

Las secuencias codificantes completas de los genes MALT1 y BCL6 se insertaron en vectores pc-DNA3 con el tag flag o myc (Invitrogen; Carlsbad, California). Este vector, al poseer un promotor de expresión de tipo citomegalovirus (CMV), permite la expresión génica de la secuencia codificante en células eucariotas. El vector pc-DNA3 es frecuentemente utilizado para inmunización con ADN. Los vectores pcDNAs fueron cedidos por el Dr. Sánchez Izquierdo (Hospital Clínico Valencia, España)

Las secuencias de las regiones codificantes de los genes MALT1 y BCL6 se confirmaron por secuenciación de ADN en la Unidad de Secuenciación del CNIO.

Los plásmidos fueron amplificados en cultivo a gran escala de *Escherichia coli* durante toda la noche y purificados mediante el kit de purificación de plásmidos libre de toxinas JETstar 2.0 (Genycell Biotech; Granada, España) siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante. El ADN fue posteriormente precipitado en etanol y resuspendido en agua destilada libre de pirógenos. Tras su cuantificación por espectrometría se almacenó a -20º C.

La habilidad de expresar *in vitro* MALT1 y BCL6 por los plásmidos pCMV-MALT1 y pCMV-BCL6 se confirmó mediante transfección transitoria en células HEK-293T con fosfato de calcio y con reactivo FuGene (Roche, Mannheim, Alemania), respectivamente.

Inmunización genética intraepidérmica: Gene-Gun

La inmunización genética se utilizó para la producción de los anticuerpos monoclonales anti-MALT1 y anti-BCL6. Antes de llevar a cabo las inmunizaciones intraepidérmicas vía *Gene Gun*, los plásmido de ADN, pCMV-MALT1 y pCMV-BCL6-Flag fueron diluidos en agua destilada libre de pirógenos a una concentración de 2 µg/µl para la preparación de los cartuchos para *Gene Gun*.

Las inmunizaciones genéticas se realizaron con el equipo *Helio-Gene Gun* (BioRad Laboratorios, Hercules, California). Para ello, 2 µg del plásmido de ADN purificado se precipitó por cloruro cálcico en 0,20 mg de partículas de oro de 1 µm de diámetro, en un medio con espermidina siguiendo las instrucciones de la casa comercial (Bio-Rad Laboratorios). Los cartuchos de 5 µg de ADN por disparo, se almacenaron en seco, a 4° C, en oscuridad y con partículas antihumedad.

En cada ronda de inmunización, los ratones fueron anestesiados con gas isofluorano para afeitar el pelo de la parte abdominal. El *Gene Gun* impulsado por helio, se utilizó a una presión de 400 psi (2758 kPa) para liberar un disparo en la epidermis de la zona inguino-abdominal de seis ratones. Las inmunizaciones se repitieron 5 veces en intervalos de 14 días. Se recolectaron muestras de suero por punción en el plexo retro-orbital al día 40 y 70 de la primera inmunización. No se observaron lesiones o daños en los ratones tras ninguna de las inmunizaciones.

El suero de los ratones se testó por IHQ. En el caso de BCL6 se testó en muestras de amígdala en congelado, mostrando todos los ratones un desarrollo de una respuesta inmune específica frente a la proteína BCL6. En el caso de MALT1, se testó en preparaciones de células HEK-293T (empleando citocentrífuga Cytospin) transfectadas con el vector pcDNA3-MALT1-Flag.

En el proceso de inmunogenización con BCL6 y MALT1, la última inmunización se realizó con células HEK-293T transfectadas con fosfato cálcico con el plásmido pCMV-BCL6 o con el plásmido pCMV-MALT1-Flag, respectivamente, tres días antes de la fusión. Para ello,

las células fueron resuspendidas en suero salino e inyectadas intraperitonealmente tras 80 días de la primera inmunización (4×10^7 células en 400 μ l) (89).

Cultivo y selección de los hibridomas de interés

Tres días después de la última inmunización, convencional o genética, se sacrificó por CO₂ el ratón cuyo suero mostró mayores títulos y una respuesta más específica frente al antígeno de interés. Se le extrajo el bazo en condiciones asépticas y los esplenocitos se fusionaron con células de MM de ratón NS-1 (P3/NS1/1-Ag4-1) utilizando el agente fusiogénico polietilenglicol de acuerdo a los protocolos convencionales (102).

Brevemente, tras la fusión, las células se diluyeron en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con suero bovino fetal australiano al 20% inactivado por calor. Posteriormente, se cultivaron a 37° C en una atmósfera de 5% de CO₂ y 98% de humedad, en 10 placas de cultivo de 24 pocillos (Nunc, Thermo Fisher, Rochester, Estados Unidos). La mezcla celular, con hibridomas y posibles células sin fusionar, se trataron con medio de cultivo fresco que contenía hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT) el día siguiente de la fusión, lo que permitió un cultivo selectivo para el crecimiento de los hibridomas.

A los 10-15 días de cultivo, cuando los pocillos mostraron un crecimiento de las colonias de hibridomas con un tamaño adecuado, se realizó un *screening* o una búsqueda y selección de aquellos pocillos en los que hubiera colonias de hibridomas productoras del anticuerpo de interés. Para ello, una pequeña parte del sobrenadante de cada pocillo se testó por IHQ en amígdala en busca de una expresión específica de los antígenos BCL6, PRDM1 y MALT1, respectivamente e individualmente para cada fusión. El hibridoma productor del anticuerpo anti-MALT1 se testó adicionalmente usando IHQ con células HEK-293T transfectadas con el vector pcDNA3-MALT1-myc.

Una vez detectados los pocillos con las colonias de hibridomas productores del anticuerpo de interés, se tomó de forma aislada cada una de las colonias del pocillo y se crecieron en cultivo. Una vez alcanzada la confluencia adecuada y tras realizar un nuevo *re-screening* del sobrenadante, se realizó una clonación por dilución límite de las células de cada pocillo en placas de 96 pocillos (Nunc).

Por último, transcurridos alrededor de 10 días de cultivar las placas de clonación, se realizó un último *screening* del sobrenadante de aquellos pocillos en los que crecía una única colonia aislada de células en busca de la producción del anticuerpo de interés.

El clon seleccionado por producir en el sobrenadante un anticuerpo monoclonal capaz de reconocer el antígeno de interés, se cultivó convenientemente y se conservó por congelación en nitrógeno líquido a -196°C.

Para obtener mayores cantidades del anticuerpo monoclonal, se realizó la expansión del clon de interés en medio de cultivo. El sobrenadante del cultivo celular se obtuvo por centrifugación a 2.000 r.p.m. durante 10 minutos.

Este procedimiento permite obtener los anticuerpos monoclonales murinos en forma líquida como sobrenadante de cultivo celular al que se le añade un contenido de azida sódica (NaN_3) a 15 mmol/L para su conservación a 4° C.

ANTICUERPOS

Los anticuerpos monoclonales producidos en los estudios que se desarrollan en esta Tesis Doctoral se resumen en la Tabla 8.

Tabla 8: Anticuerpos primarios producidos

Anticuerpos Producidos	Clon Isotipo	Procedencia Antígeno	Dilución Desenmascaramiento	Visualización	Localización	Control interno
BCL6	ST42B/H7 IgG1/κ	CNIO GST-BCL6	1:5 – Citrato+PK	LSAB	Núcleo	Células CG
BCL6	GI191E/A8 IgG1/κ	CNIO pCMV-BCL6	1:100 – Citrato+PK	LSAB	Núcleo	Células CG
PRDM1	ROS IgG1/κ	CNIO GST-PRDM1	1:1 – Tris/EDTA	EnVision DL	Núcleo	Células plasmáticas
MALT1	RON169 IgG1	CNIO pcDNA3- MALT1	1:1 – Tris/EDTA	EnVision DL	Citoplasma	Células plasmáticas

Abreviaturas: PK: Proteinasa K, LSAB: sistema de visualización basado en estreptavidina-biotina, Cél. Celular.; CG: centro germinal. Tabla elaboración propia

El resto de los anticuerpos utilizados en los diferentes estudios aparecen detallados en la Tabla 9. Se incluyen diferentes anticuerpos comerciales y los anticuerpos cedidos por diferentes grupos de investigación: anti-PRDM1 (policlonal de conejo, cedido por el Dr. Mark M. Davis,

Departamento de Microbiología e Inmunología, Stanford University School of Medicine, Standford, Estados Unidos(55)); anti-p63 (clon VS38c, cedido por el Prof. David Y. Mason, Leucemia Research Found, Immunodiagnostic Unit, Nuffield Department of Clinical Laboratory Sciences, John Radcliffe Hospital, Oxford, Reino Unido); anti-ALK (clon ALK1, cedido por Prof. David Y. Mason), anti-CD30 (clon CON6D/B5, cedido por Giovanna Roncador, Unidad de Anticuerpos, CNIO, Madrid, España) y anti-BCL6 (clon ST42B/H7, producido en la presente Tesis Doctoral por inmunización convencional).

Tabla 9: Anticuerpos primarios comerciales y cedidos por otros laboratorios.

Otros Abs	Clon/Poli	Procedencia	Dilución Desenmascaramiento	Visualización	Localización	Control interno
ALK	ALK1	Prof. D. Y. M.	1:1 – Tris/EDTA	EnVision DL	Citoplasma	Células T ALCL
BCL6	PG-B6p	Dako	1:10 – Tris/EDTA	EnVision DL	Núcleo	Células G
CD3	P. Conejo	Dako	1:100 – Tris/EDTA	EnVision DL	Citoplasma	Células T
CD3	F7.2.38	Dako	1:50 – Tris/EDTA	Doble IF	Citoplasma	Células T
CD8	P. Conejo	Abcam	1:100 – Tris/EDTA	Doble IF	Membrana	Población Células T
CD10	56C6	Novocastra	1:10 – Tris/EDTA	EnVision DL	Membrana	Células CG
CD30	CON6D/B5	G. R.	1:1 – Tris/EDTA	EnVision DL	Membrana	Células T activadas
CD138	MI15	Dako	1:50 – Tris/EDTA	EnVision DL	Membrana	Células plasmáticas
MUM1/IRF4	P. Conejo	Santa Cruz	1:200 – Tris/EDTA	EnVision DL	Núcleo	Células plasmáticas
P63	VS38	Prof. D. Y. M.	1:1 – Tris/EDTA	EnVision DL	Citoplasma	Células plasmáticas
PRDM1	P. Conejo	Dr. Mark M. Davis	Tejido Congelado	EnVision DL	Núcleo	Células plasmáticas
MALT1	P. Conejo	Santa Cruz	1:100	EnVision DL	Citoplasma	Células CG

Abcam, Cambridge, Reino Unido (anti-CD8); Ab M.: Anticuerpo Monoclonal; ALCL: Linfoma anaplásico de células grandes; Dako: Dako Diagnósticos S. A. (Glostrup, Dinamarca); G. R.: Giovanna Roncador; IF: Inmunofluorescencia; Novocastra: Novocastra, Leica Biosystems Newcastle, Reino Unido (anti-CD10, referencia NCL-CD10-270); Prof. D. Y. M.: Profesor David Y. Mason; Santa Cruz: Biotechnology, Santa Cruz, Estados Unidos (anti- MUM1/IRF4, referencia sc-514332; anti-MALT1, H-300; referencia sc-28246). Tabla elaboración propia.

PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

Los sobrenadantes de cultivo celular de los clones de hibridomas: GI191E/A8 y ST42B/H7, productores de anticuerpos monoclonales anti-BCL6, se solubilizaron en tampón de fosfato sódico salino 20 mM (pH 7). Estas soluciones se filtraron a través de filtros de 0,45 µm y se pasaron por columnas de afinidad de 5 ml HiTrap (Protein G HP, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia), integradas en el sistema AKTA Prime (Amersham Pharmacia Biotech), siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

Las muestras fueron cargadas a 5 ml/minuto y la columna lavada con diferentes volúmenes de tampón de equilibrado. Las muestras fueron después eluidas en un único paso con una mezcla 0,1M HCl-glicina (pH 2,7). Las fracciones que contenían IgG, determinado por cromatografía, se recuperaron en tubos con 100 µl 1M de Tris-HCl (pH 9) para alcanzar un pH aproximadamente neutro y mantener así la actividad de las IgG.

Las fracciones que contenían las IgG purificadas se dializaron en tampón salino toda la noche a 4° C. La concentración final se determinó por absorción ABS₂₈₀ por espectrofotometría.

ENSAYOS DE AFINIDAD DE ANTICUERPOS PRIMARIOS

Se realizaron estudios de afinidad con los anticuerpos anti-BCL6 (clones GI191E/A8 y ST42B/H7) mediante enzimo-inmunoanálisis, ELISA. Para ello, diferentes placas de 96 pocillos se recubrieron con 50 µl de la proteína BCL6 purificada a una concentración final de 5 µg/ml y se incubó durante 1 hora a 37° C. Tras sucesivos lavados con PBS-Tween los pocillos de las placas se saturaron con leche en polvo al 2% en PBS-Tween a 4° C durante toda la noche.

Los diferentes anticuerpos diluidos serialmente a una concentración de 400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56, 0,78, 0,39 y 0,2 nM se incubaron por duplicado en los pocillos de las placas recubiertas con BCL6, durante 1 hora a 37° C. Tras lavar con PBS-Tween, se añadió un anticuerpo secundario conjugado con la enzima peroxidasa (HRP) de cabra anti-ratón (Dako), diluido 1:1000, durante 1 hora a 37° C. Las placas se lavaron posteriormente y fueron reveladas con el kit de revelado de peroxidasa siguiendo las instrucciones del fabricante (BioRad), durante 15 minutos. La reacción se detuvo al añadir docecil sulfato sódico (SDS) al 0,5% y la cuantificación se realizó por densidad óptica a 405 nm.

ELECTROFORESIS EN GEL DE ACRILAMIDA EN PRESENCIA DE DODECIL SULFATO SÓDICO (SDS-PAGE) Y WESTERN BLOTTING (WB)

Los anticuerpos monoclonales producidos se caracterizaron mediante la técnica de WB, que permite conocer su especificidad y el peso molecular del antígeno tisular/celular que reconocen.

La electroforesis en gel de acrilamida-bisacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico y el WB se realizaron según un protocolo convencional (103). Brevemente, se preparó un

lisado a partir de una línea celular o tejido de interés concreto para estudiar la presencia del antígeno específico. Para ello se utilizó un tampón de lisis RIPA e inhibidores de proteasa (Complete, Roche, Mannheim, Alemania). La concentración de la proteína obtenida de los diferentes lisados celulares o tisulares se analizó por el método Bradford (104), utilizando albúmina bovina como estándar y siguiendo protocolos convencionales.

Posteriormente, las proteínas de los diferentes lisados, tras separarse en geles desnaturalizantes de SDS-PAGE (a unas concentraciones entre el 10 y el 15%, Bio-Rad), fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Hybond ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Reino Unido) mediante el uso de una corriente eléctrica. Una vez acabada la transferencia, las diferentes membranas se cortaron en tiras y se incubaron secuencialmente con la solución de bloqueo (leche en polvo desnatada al 5% en PBS/0,1% Tween 2) y el anticuerpo primario de interés. Para visualizar la proteína reconocida por el anticuerpo primario, la porción de membrana de interés se incubó con un anticuerpo secundario ligado a una enzima peroxidasa (Dako, HPR, diluido 1:1000 en PBS). La unión se visualizó mediante la adición del sustrato enzimático apropiado (Amersham Biosciences, RPN2109). Como controles de carga, las membranas se incubaron bien con el anticuerpo monoclonal para la detección de beta-actina (1:3.000, Sigma, St. Louis, MO, Estados Unidos) o con el anticuerpo monoclonal para la detección alfa-tubulina (1:10.000, Sigma).

Para la caracterización de los anticuerpos anti-BCL6, se utilizaron homogeneizados de líneas celulares: Ramos, AKATA y Mutu-1 (Burkitt); KARPAS-422, DB y Toledo (LDCBG) y REH (leucemia linfoblástica aguda); y de tejidos frescos: timo y amígdala.

Para la caracterización del anticuerpo anti-PRDM1 se utilizaron lisados de diferentes líneas celulares derivadas de MM (RPMI-8226, L363, SKMM2, KARPAS-620, NCI-H929, OPM2, LP1) y de linfoma de Burkitt (Raji); así como homogeneizados tisulares de timo y amígdala.

Para la caracterización del anticuerpo anti-MALT1, clon RON169, se utilizaron lisados de células de la línea celular de MM, U-266. Posteriormente fue testado con lisados de diferentes líneas celulares de MM (RPMI8226, SK-MM-2, JJN-3, OMP-2, LP-1, NCL-H929, K620 y L363), de linfoma y leucemia (SSK41, MD90, RC-K8, RIVA, SU-DHL-8, 380, DB, DOHH2, K231 y K422), y en una línea murina de células pro-B (Ba/F3).

INMUNOPRECIPITACIÓN

Para la IP de PRDM1, un extracto tisular obtenido a partir de una amígdala congelada e incluida en OCT, se lavó con PBS a 4° C y se lisó con tampón de lisis (50 mM/L Tris [tris(hydroxymethyl)aminomethane]-HCl, pH 8, 1% Triton X-100, 150 mM/L NaCl, e inhibidores de proteasa). Dos muestras del lisado celular (1 mg de proteína) se incubaron durante 12 horas a 4° C por separado con dos anticuerpos anti-PRDM1: el nuevo anticuerpo monoclonal producido, clon ROS; y el anticuerpo policlonal, cedido por el Dr. Mark M. Davis (ver Tabla 9).

Tras la incubación, a ambas muestras se les añadió por separado la proteína-G-sefarosa (Santa Cruz Biotechnology) y se incubaron durante 3 horas a 4° C. Las mezclas se centrifugaron durante 1 minuto a 1.500 r.p.m. y ambos precipitados se lavaron cuatro veces por centrifugación con el tampón HNTG (Hepes a 20 mM-pH 7.5, NaCl a 150 mM, Triton X-100 al 0.1% y Glicerol al 10%), descartando el sobrenadante. Tras un último lavado con PBS, se descartó el PBS de ambos precipitados y se resuspendieron por separado con tampón de carga de electroforesis.

Los inmunoprecipitados tisulares provenientes del anticuerpo monoclonal, clon ROS y del anticuerpo policlonal anti-PRDM1, se separaron por electroforesis SDS-PAGE al 15%, siguiendo el protocolo convencional descrito previamente. Tras realizar la transferencia a una membrana de nitrocelulosa, ésta se incubó secuencialmente con la solución de bloqueo (leche en polvo desnatada al 5% en PBS/0,1% Tween 2) y el anticuerpo monoclonal anti-PRDM1 (clon ROS) y se reveló mediante el anticuerpo secundario conjugado con HRP y una detección quimioluminiscente (Amersham), como se ha descrito previamente.

Para la IP de MALT1, las células fueron lisadas con tampón de lisis (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1% Igepal [Sigma, ST Louis, MO], 150 mM NaCl, e inhibidores de proteasa [Roche]). Los lisados celulares se incubaron con agitación a 4° C por separado con dos anticuerpos anti-MALT1: el nuevo anticuerpo monoclonal producido, clon RON169 (40µl de sobrenadante, 1 hora); y el anticuerpo policlonal H300 anti-MALT1 (2µg, toda la noche) (ver Tabla 9).

Tras la incubación, ambas muestras fueron inmunoprecipitadas con la proteína-G-sefarosa (Sigma). Las mezclas se centrifugaron durante 1 minuto a 1.500 r.p.m. y ambos precipitados se lavaron cuatro veces por centrifugación con el tampón HNTG (Hepes a 20 mM-pH 7,5, NaCl a 150 mM, Triton X-100 al 0.1% y Glicerol al 10%). Las proteínas inmunoprecipitadas y el total de los lisados se desnaturizaron por separado calentándolas con

tampón de carga de electroforesis (Laemmli) y se separaron por electroforesis SDS-PAGE al 7,5 o 10%. Tras realizar la transferencia a una membrana de nitrocelulosa durante 2 horas, la membrana se incubó toda la noche con solución de bloqueo (5% leche en PBS) y posteriormente durante 1 hora a temperatura ambiente con los anticuerpos: RON169 (sobrenadante), H300 (1:100), β -actina (1:10000) y α -tubulina (1:10000) (Sigma). Finalmente la membrana se reveló mediante el anticuerpo secundario conjugado con HRP y una detección quimioluminiscente (Amersham).

TÉCNICAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA Y DE INMUNOFLUORESCENCIA

Para la detección del antígeno reconocido por los diferentes anticuerpos en secciones de tejido y en preparaciones de citocentrífuga o citospines de líneas celulares se realizaron diferentes técnicas de IHQ y de inmunofluorescencia que se detallan a continuación.

Todas las técnicas de IHQ empleadas en este trabajo se realizaron con el sistema automatizado TechMate 500 (Dako), a excepción de la IHQ realizada para el *screening* de los hibridomas, realizada manualmente debido a la escasa cantidad disponible de sobrenadante de los hibridomas en el que se encuentra anticuerpo de interés.

Como controles de las técnicas de IHQ y de inmunofluorescencia se realizaron incubaciones omitiendo el anticuerpo primario.

Inmunohistoquímica en tejido congelado y en preparaciones de citocentrífuga

La detección antigenica por IHQ en secciones de tejido congelado (de 6 μm de grosor) y en las preparaciones de líneas celulares mediante citospin se realizó mediante una IHQ indirecta convencional.

Brevemente, los portaobjetos con las diferentes secciones de tejido y/o con los diferentes citospines de líneas celulares se fijaron para su conservación antigenica en acetona pura a 4° C durante 10 minutos. Tras dejar evaporar la acetona, los portaobjetos se incubaron con el respectivo anticuerpo primario de interés diluido convenientemente a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente, los portaobjetos se lavaron con PBS y se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (de cabra anti-ratón-HRP, o de cabra anti conejo HRP, Dako) diluido 1:100 durante 30 minutos. La IHQ se reveló cromogénicamente con diaminobencidina (DAB, Dako) durante 5 minutos. Previo al montaje, los portaobjetos se lavaron con agua destilada y se contrastaron con hematoxilina.

El revelado con DAB, como sustrato de la peroxidasa, proporciona un color marrón localizado específicamente en las zonas donde se encuentra el antígeno que es reconocido por el anticuerpo primario. Los controles negativos se obtuvieron omitiendo el anticuerpo primario de interés y utilizando citospines y tejidos control que no expresan el antígeno de interés.

Inmunohistoquímica convencional en tejido incluido en parafina

Muestras de tejido

Tanto los bloques de tejido completo fijados en formol e incluidos en parafina, como las distintas matrices de tejido se cortaron con un grosor de entre 2 y 4 µm. Las secciones se adhirieron utilizando portas silanizados (Dako), consiguiendo la adherencia del tejido mediante secado a 37° C durante toda la noche y estufado a 60° C durante 1 hora.

Las diferentes secciones se des-parafinaron utilizando 2 baños de xilol (10 minutos a temperatura ambiente) y se re-hidrataron en una serie de alcoholes decrecientes (al 100%, 95% y 70%) hasta agua destilada, durante 5 minutos en cada uno de los pasos.

Desenmascaramiento antigénico

Para el desenmascaramiento antigénico, se testaron diferentes soluciones de desenmascaramiento, en busca de la IHQ óptima. Las soluciones empleadas de forma específica para cada anticuerpo, fueron: a) 1 mM EDTA (pH 8), b) 0,01 M citrato (pH 6,5) y c) 50 mM Tris (Trizma base)-2 mM EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) (pH 9).

Para llevar a cabo el proceso de desenmascaramiento se emplearon la olla a presión de acero inoxidable (WMF Perfect Plus, con una presión de 0,09 bares a 117° C) u b) y la olla a presión para microondas (A. Menarini Diagnostics, Workinham, Reino Unido, a 900 W durante 2 minutos).

Por último destacar que, para optimizar la IHQ de algunos de los anticuerpos, se utilizó un desenmascaramiento antigénico enzimático caracterizado por la incubación con proteinasa K (Dako) durante 5 minutos, previo al marcaje inmunohistoquímico.

Sistemas de visualización

Los sistemas de detección antigénica por IHQ que se utilizaron de forma rutinaria para teñir las diferentes secciones de tejido fijado en formol e incluido en parafina se basan en sistemas de visualización enzimáticos, con la enzima HRP, y cromogénicos que, al utilizar DAB como sustrato de la HRP, proporcionan un color marrón en las zonas específicas de unión del anticuerpo primario.

Tras el desenmascaramiento antigénico y el atemperado de los portaobjetos, y previamente a la incubación de los anticuerpos primarios, se realizó un bloqueo de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3% (Dako) durante 5 minutos, lo que evitó una posible señal inespecífica de las enzimas peroxidases endógenas.

Posteriormente, el anticuerpo primario diluido convenientemente se detectó mediante dos sistemas de visualización:

- a) LSAB (Dako): basado en una incubación con Ig biotiniladas (25 minutos) y seguido por una incubación con estreptavidina-peroxidasa-HRP (25 minutos) y un revelado con DAB (10 minutos).
- b) EnVision (Dako): basado en la utilización de un polímero EnVision Dual Link™ que, tras una incubación de 30 minutos, se une específicamente al anticuerpo primario y permite un revelado directo con DAB al tener unido el propio polímero la enzima HRP.

Las secciones de tejido se contrastaron con hematoxilina de Mayer durante 5 minutos y tras su deshidratado en alcoholes crecientes y dos baños en xilol de 5 minutos cada uno, se montaron permanentemente.

Cuantificación de la expresión antigénica por inmunohistoquímica

La expresión de las diferentes proteínas (BCL6, PRDM1 y MALT1), en secciones de tejido completo y en matrices de tejidos humanos normales y tumorales, se cuantificó y analizó por IHQ. En general, el patrón de expresión de cada marcador se registró como positivo o negativo teniendo en cuenta la expresión en células normales y tumorales.

La expresión de PRDM1 en las diferentes neoplasias linfoides se valoró semi-quantitativamente en base al número de células positivas. Se distinguieron casos PRDM1 negativos, con menos de un 10% de las células tumorales positivas, casos con una expresión

débil de PRDM1, con un número de células tumorales positivas entre un 10 y un 50% y casos con expresión fuerte de PRDM1, donde más de un 50% de las células tumorales eran positivas.

Doble tinción inmunohistoquímica

Los estudios de co-expresión de diferentes antígenos se realizaron, mediante una doble IHQ cromogénica secuencial. Estas técnicas permiten la caracterización de las diferentes estirpes celulares que expresan el antígeno de interés.

Para la caracterización de PRDM1, el anticuerpo primario anti-PRDM1 (clon ROS) se visualizó con EnVision DL conjugado con peroxidasa (Dako) y se reveló con diaminobencidina (color marrón). La mismas secciones se incubación posteriormente con un segundo anticuerpo primario (CD3 o CD138, respectivamente) y se visualizaron con EnVision DL conjugado con fosfatasa alcalina (Dako) y el kit del sustrato de la enzima fosfatasa alcalina de Vector (color azul, Vector Laboratorios, Peterborough, Reino Unido), siguiendo las instrucciones de la casa comercial (105). Estos portaobjetos, sin contrateñir con hematoxilina, se deshidrataron y montaron de forma convencional.

Inmunofluorescencia indirecta simple o doble combinada con inmunohistoquímica

Para la caracterización del anticuerpo anti-PRDM1 (clon ROS), la inmunofluorescencia indirecta simple o doble combinada con IHQ se realizó en secciones de amígdala reactiva, de linfoma anaplásico de células grandes ALK-positivo, de linfoma T periférico y de linfoma de Hodgkin clásico siguiendo un método descrito previamente (106, 107).

Brevemente, tras una IHQ convencional de PRDM1 con el sistema de visualización EnVision DL, las secciones se revelado con diaminobencidina (pero sin contrateñir con hematoxilina). Posteriormente, las secciones se lavaron en PBS y se bloquearon los sitios de unión inespecífica con suero bovino fetal durante 10 minutos.

A continuación, se realizó una inmunofluorescencia indirecta como se ha detallado previamente con: a) una mezcla de los anticuerpos p63/VS38c (clon VS38c de ratón y con isotipo IgG1) y CD20 (clon LS6 de ratón y con isotipo Ig2a) en las secciones de amígdala; b) una mezcla de los anticuerpos ALK (clon ALK1 de ratón y con isotipo IgG3) y CD138 (clon MI15 de ratón y con isotipo IgG1) en las secciones de linfomas anaplásico de células grandes

ALK-positivo; c) el anticuerpo CD3 en las secciones de linfomas T periféricos; o d) el anticuerpo CD30 en las secciones de linfoma de Hodgkin clásico.

Los anticuerpos p63/VS38c, ALK y CD3 se detectaron con un anticuerpo secundario específico de cada isotipo conjugado con Alexa 594 para detectarse en el canal rojo. Por otro lado, los anticuerpos CD20, CD138 y CD30 se detectaron con un anticuerpo secundario específico de cada isotipo conjugado con Alexa 488 para detectarse en el canal verde.

Tras el montaje con un medio de montaje de fluorescencia con DAPI, los portaobjetos se examinaron con el sistema de microscopía de fluorescencia Nikon E800 Eclipse. Se capturaron diferentes imágenes y se ajustaron con el software Photoshop. La imagen de peroxidasa, correspondiente a la IHQ de PRDM1, se examinó con la luz transmitida del microscopio; la correspondiente escala de grises se invirtió y se pegó en el canal azul (o rojo en las secciones de linfoma de Hodgkin) de la imagen RGB -roja-verde-azul- de Photoshop. De esta forma, la expresión de PRDM1 se visualizó en azul (excepto en linfomas de Hodgkin, que se visualizó en rojo) mientras que la inmunofluorescencia se detectó en el correspondiente canal, verde o rojo dependiendo del fluorocromo del anticuerpo secundario utilizado.

Todas las secciones analizadas con esta técnica mostraron células plasmáticas PRDM1-positivas y se utilizaron como control interno de la técnica.

Esta técnica permite estudios de expresión de hasta tres抗ígenos diferentes en una misma sección de tejido.

SERIES CLÍNICAS

Se dispuso de datos clínicos y de seguimiento de 140 casos de LDCBG diagnosticados entre 1990 y 1999. Los pacientes incluidos habían recibido diferentes esquemas de tratamiento, incluyendo quimioterapia con diferentes drogas (principalmente basados en adriamicina) con o sin radioterapia adyuvante y/o cirugía. Los datos de género, respuesta al tratamiento, del Índice de Pronóstico Internacional y de seguimiento de la enfermedad fueron adquiridos siguiendo protocolos estándar (99). Un subgrupo de estos casos de LDCBG había sido utilizado en un estudio previo donde se describe más detalladamente la selección de los pacientes (99).

Adicionalmente se dispuso de datos de los estadios clínicos Rai y Bidet y de seguimiento de 36 casos de LLC-B/SLL cuya primera línea de tratamiento fue clorambucil y CHOP, y que fueron seleccionados y utilizados en un estudio previo (108).

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

En los estudios que emplean series de linfomas en secciones completas y/o en matrices tisulares se utilizó un análisis de la supervivencia para medir el impacto en el curso clínico de la expresión de los diferentes marcadores. En dicho análisis se valora la media de supervivencia, la supervivencia libre de fallo (definido como progresión de la enfermedad, recaída o muerte) y la supervivencia libre de enfermedad, utilizando para ello curvas de supervivencia según el método de Kaplan-Meier.

Las asociaciones estadísticamente significativas entre variables individuales y la supervivencia se determinaron utilizando el test log-rank tomando un valor $p < 0.05$ como significativo. Para el análisis se utilizó el software SPSS (SPSS Inc. Chicago, 1999).

RESULTADOS EN PUBLICACIONES ORIGINALES

ARTÍCULOS ORIGINALES

Los resultados de los estudios que constituyen la base de la presente Tesis Doctoral han sido recogidos en las siguientes publicaciones:

Artículo 1:

Garcia JF, Garcia JF, Maestre L, Lucas E, Sanchez-Verde L, Romero-Chala S, Piris MA, Roncador G. “*Genetic immunization: a new monoclonal antibody for the detection of BCL6 protein in paraffin sections.*” **Journal of Histochemistry and Cytochemistry.** 2006 Jan; 54(1):31-8.

Artículo 2:

Maestre L, Fontan L, Martinez-Climent JA, **Garcia JF**, Cigudosa JC, Roncador G. “*Generation of a new monoclonal antibody against MALT1 by genetic immunization*”. **Hybridoma** (Larchmt). 2007 Apr;26(2):86-91

Artículo 3:

Garcia JF, Roncador G, Garcia JF, Sanz AI, Maestre L, Lucas E, Montes-Moreno S, Fernandez Victoria R, Martinez-Torrecuadrara JL, Marafioti T, Mason DY, Piris MA. “*PRDM1/BLIMP-1 expression in multiple B and T-cell lymphoma.*” **Haematologica/The Hematology Journal.** 2006 Apr; 91(4):467-74.

Garcia JF, Garcia JF, Maestre L, Lucas E, Sanchez-Verde L, Romero-Chala S, Piris MA, Roncador G. “*Genetic immunization: a new monoclonal antibody for the detection of BCL-6 protein in paraffin sections.*” **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**. 2006 Jan; 54(1):31-8.

ARTICLE

Genetic Immunization: A New Monoclonal Antibody for the Detection of BCL-6 Protein in Paraffin Sections

José-Francisco García, Juan-Fernando García, Lorena Maestre, Elena Lucas, Lydia Sánchez-Verde, Silvia Romero-Chala, Miguel-Ángel Piris, and Giovanna Roncador

Monoclonal Antibodies Unit (J-FG, LM, EL, GR), Histology and Immunochemistry Unit (LS-V), Protein Technology Unit (SR-C), Biotechnology Program, Molecular Pathology Program (J-FG, M-AP), Spanish National Cancer Centre (CNIO), Madrid, Spain

SUMMARY Genetic immunization can be combined with hybridoma technology to generate high-affinity monoclonal antibodies (MAbs). A new anti-BCL-6 MAb (GI191E/A8) was produced by cloning full-length BCL-6 cDNA into a eukaryotic vector and delivering this into mouse epidermis using a helium gene gun. A comparative study was made of the specificity and the effects of formalin fixation on immunohistochemistry quality of GI191E/A8 and two other anti-BCL-6 MAbs. To evaluate its possible application to differential diagnosis of lymphomas, two tissue microarrays (89 diffuse large B-cell lymphomas and 24 B-cell chronic lymphocytic leukemia cases) were stained with GI191E/A8 and another anti-BCL-6 MAb produced by conventional means. Using GI191E/A8, the detection of BCL-6 protein was significantly increased, and its specificity was independent of formalin-fixation time. Using automatic quantified analysis, the correlation between the two anti-BCL-6 MAbs tested was identical in cases with overexpression or absence of BCL-6. In cases with intermediate BCL-6 protein expression, detection with GI191E/A8 was more sensitive. A significant association of higher BCL-6 expression and longer median overall survival times in diffuse large B-cell lymphomas was found. Using conventionally produced MAbs in the same patient group, the association was not significant. (*J Histochem Cytochem* 54:31–38, 2006)

KEY WORDS

BCL-6
formalin fixed
genetic immunization
monoclonal antibody
lymphomas

DURING THE PAST DECADE, genetic immunization (GI) using plasmid DNA containing the gene for an antigen of interest has been intensively investigated with a view to developing it as a new form of vaccination (Gurunathan et al. 2000). Its effectiveness at eliciting both humoral and cellular immune responses has led to this technique also being successfully applied to the generation of high-affinity polyclonal antibodies (Abs) (Chambers and Johnston 2003) and high-quality monoclonal antibodies (MAbs) (Barry et al. 1994; Krasemann et al. 1999; Kilpatrick et al. 2002; Nagata et al. 2003). The application of GI to the production of MAbs was first tested by Barry et al. (1994), who produced different MAbs against the human growth hormone pro-

tein that could recognize both the native and denatured forms of the protein. Subsequently, GI has been used to obtain MAbs against defined portions of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin and to identify hepatitis-G virus particles in human serum (Ulivieri et al. 1996; Schmolke et al. 1998). It has also been used to produce MAbs that recognize different types of proteins, including the Flt-3 receptor (Kilpatrick et al. 1998), human thyrotropin receptor (Costagliola et al. 1998), and the phosphoprotein PED/PEA-15 (Kilpatrick et al. 2000). GI is an efficient method for generating MAbs that can be used for Ab-based therapies against native forms of membrane proteins such as CD30 and Ret protein (Nagata et al. 2003).

One of the main advantages of GI is the fact that proteins are synthesized *in vivo*, resulting in production of proteins in their natural conformation. Therefore, GI-produced MAbs are mainly high affinity and recognize the native form of the protein (Barry et al. 1994). This method is also extremely useful in those cases where the protein is unavailable or difficult to

Correspondence to: Giovanna Roncador, Monoclonal Antibodies Unit, Biotechnology Program, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (Spanish National Cancer Centre), C/Melchor Fernández Almagro 3, E-28029, Madrid, Spain. E-mail: groncador@cnio.es

Received for publication February 7, 2005; accepted July 11, 2005 [DOI: 10.1369/jhc.5A6646.2005].

produce, such as membrane-bound or secreted proteins (Nagata et al. 2003).

However, the successful application of this technique for generating MAbs has been hindered by technical problems such as low efficiency, with the consequence that very few hybridomas have been produced. This problem has been solved by giving mice that have previously been genetically immunized a final boost, using purified protein (Costagliola et al. 1998; Krasemann et al. 1999) or cells lines expressing the protein of interest (Nagata et al. 2003).

BCL-6 is a zinc-finger transcriptional repressor required for germinal-center (GC) formation, Ab-affinity maturation, and T-helper-2-mediated responses (Ye et al. 1997). The BCL-6 gene is frequently translocated and hypermutated in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). Its expression is also important as an independent predictor of overall survival (OS) in DLBCL, where expression of BCL-6 is associated with improved OS, suggesting a GC origin for these tumors (Lossos et al. 2001). BCL-6 is expressed in all GC-derived B-cell tumors such as Burkitt's lymphoma, DLBCL, and follicular lymphoma. For this reason, the use of anti-BCL-6 MAbs has been an indispensable tool for the classification and diagnosis of B-cell neoplasms (Falini and Mason 2002).

The aim of our study was to demonstrate that GI is a viable and effective alternative method for production of MAbs for immunohistochemistry (IHC) on paraffin sections. For this purpose, we generated two anti-BCL-6 MAbs; one produced using GI and the second using glutathione S-transferase (GST) recombinant protein produced in bacteria. The specificity of the new GI-produced MAb was tested on paraffin sections using the pressure-cooking method of antigen retrieval and a variety of different buffers. Furthermore, the effect of formalin fixation on GI191E/A8 IHC quality was compared with two other anti-BCL-6 MAbs.

To confirm its possible application as a diagnostic marker, we examined BCL-6 protein expression using tissue microarrays (TMAs) for DLBCL and B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL), which are common examples of BCL-6-positive and -negative lymphoproliferative neoplasms, respectively. The results obtained using GI191E/A8 and ST42B/H7 MAbs were compared.

Materials and Methods

Mice

BALB/c mice were maintained under specific pathogen-free conditions and handled in laminar-flow isolation hoods in a barrier facility in the Animal Facility Unit of the Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO). All animal experiments were performed under the experimental protocol approved by the Institutional Committee for Care and Use of Animals, CEUCA no. 001/02.

Plasmid DNAs

The human full-length coding sequence of BCL-6 was inserted into the pc-DNA3 vector (Invitrogen; Carlsbad, CA), which contains a cytomegalovirus (CMV) promoter for gene expression and is commonly used for DNA immunization. The sequence of the BCL-6 encoding region was confirmed by DNA sequencing. The plasmid was amplified in *Escherichia coli* overnight in large-scale cultures and purified using the JETstar 2.0 endotoxin-free plasmid-purification kit (Genecell Biotech; Granada, Spain) according to the manufacturer's instructions. DNA was precipitated in ethanol, resuspended in pyrogen-free water, quantified by spectrophotometry, and stored at 220°C.

The ability of the constructed pCMV-BCL6 plasmid to mediate in vitro expression of BCL-6 was confirmed by calcium phosphate-mediated transient transfection of HEK-293T cells (American Type Culture Collection; Rockville, MD). Before immunization, DNA was diluted in pyrogen-free water to appropriate concentrations (2 µg/µl) for the preparation of Gene Gun (GG) cartridges.

Immunization and Production of MAbs by GI

Intradermal GI was performed using a Helios GG delivery system (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA). Two µg of purified plasmid DNA was precipitated onto 0.20 mg of 1-µm-diameter gold beads by CaCl₂ in the presence of spermidine, according to the manufacturer's instructions (Bio-Rad Laboratories). Bullets (5 µg DNA/shot) were stored in a dry atmosphere at 4°C in the dark, in the presence of desiccant pellets.

Mice were anesthetized with isoflourane gas for shaving off abdominal fur and for all immunization times. The helium-powered GG was used at 400 psi (2758 kPa) to deliver one shot to the inguino-abdominal skin of six mice. Immunizations were repeated five times at 14-day intervals, and serum samples were collected by puncture of the retro-orbital plexus after 40 and 70 days. Lesion discomfort or pain was not observed in the experimental mice after GG-immunization. Mouse serum was tested on frozen tonsil sections by IHC, showing that all mice developed strong and specific Ab responses. The last boost was performed using HEK-293T cells transfected with pCMV-BCL6 plasmid. Cells washed and resuspended in PBS (pH 7) were injected on day 80 (4×10^7 cells in 400 µl) into the mouse's intraperitoneal cavity (Nagata et al. 2003). Spleen cells were harvested 84 hr after the last cell boost for cell fusion with the NS-1 myeloma cell line (P3/NS1/1-Ag4-1) using the conventional technique (Mason et al. 1983). Initial screening was performed using an immunoperoxidase technique on cryostat sections of normal tonsil.

Western Blotting and Cell Lines

The GI191E/A8 MAb was characterized by Western blotting (WB) in a full range of cell lines and tissues using conventional technique (Sanchez-Aguilera et al. 2004). The non-Hodgkin's lymphoma-derived cell lines Toledo (DLBCL) and Ramos (Burkitt's lymphoma) were obtained from the American Type Culture Collection. The cell lines KARPAS-422 (DLBCL), DB (DLBCL), and REH (acute lymphoblastic leukemia) were obtained from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ; Braunschweig,

Genetic Immunization for Antibody Production

33

Germany). The Burkitt's lymphoma-derived cell lines Mutu-1 (Gregory et al. 1990) and AKATA (Takada et al. 1991) were kindly provided by Dr. Miguel Campanero (Centro de Investigaciones Biológicas; Madrid, Spain).

Tissue Samples

Biopsy samples (five normal tonsils, 89 DLBCL, and 24 B-CLL lymphomas cases fixed in formalin and embedded in paraffin by conventional techniques) were obtained from the tissue archives of the CNIO Tumour Bank Network. All tissue samples were collected following the protocols established by the Tumour Bank Network and represented randomly chosen consecutive biopsies. Informed consent was obtained from all patients enrolled in the study under the supervision of the local ethical committees. All samples were centrally reviewed by a panel of pathologists and diagnosed using uniform criteria based on clinical, histological, immunophenotypical, and molecular characteristics (Harris et al. 2000). All B-CLL samples corresponded to tumoral lymph nodes involved by B-CLL/small lymphocytic lymphoma. Tissue sections (2–4 µm) were cut onto Dako slides (DakoCytomation; Glostrup, Denmark), incubated at 60°C overnight, and deparaffinized twice using xylene (10 min, room temperature). Slides were hydrated in a series of ethanol solutions (100, 95, and 75% for 5 min each) and then washed with PBS.

To study the effect of formalin fixation on the quality of BCL-6 IHC, two samples of normal tonsil were cut into five pieces. Four pieces of each were fixed in 10% neutral buffered formalin (Panreac; Barcelona, Spain) for different times (12, 24, and 48 hr and 1 week, respectively), whereas the fifth piece was fixed for 1 hr in B5 fixative (Panreac). All samples were then processed and embedded in paraffin.

Antigen Retrieval

The tested retrieval solutions were 1 mM EDTA (pH 8) and 0.01 M citrate buffer (pH 6.5). Two liters of each retrieval

solution were placed in a 6-liter stainless steel pressure cooker with an operating pressure of 0.09 bars at 117°C (WMF Perfect Plus; Madrid, Spain) and brought to a boil on an electric hotplate without sealing the lid. The slides were placed in a metal rack and lowered into the boiling buffer. The pressure cooker was then sealed and brought to full pressure. Thereafter, it was depressurized using running tap water and the lid removed. An additional step of 10-min incubation with proteinase K (40×) diluted in proteinase K diluent (DakoCytomation) was applied to some of the slides previously treated with 0.01 M citrate buffer (pH 6.5).

Source of Antibodies

IHC studies were performed using three MAbs that are reactive on paraffin sections. The first was anti-BCL-6 (clone PG-B6p; DakoCytomation); the other two were MAbs against BCL-6 produced by the Monoclonal Antibody Unit of the CNIO: clone ST42B/H7 produced using recombinant GST-BCL-6 recombinant protein and clone GI191E/A8 produced by GI.

WB study was performed using the GI191E/A8 MAbs (diluted 1:2 in PBS with 10% fetal calf serum) and anti- α -tubulin (diluted 1:10,000) (Sigma Chemical Company; St. Louis, MO).

Antibody Purification

Tissue-culture supernatants of GI191E/A8 and ST42B/H7 clones were solubilized in 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7). These solutions were filtered through 0.45-µm filters and applied to 5 ml HiTrap affinity columns (Protein G HP; Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) previously equilibrated in 20 mM of buffered phosphate (pH 7), integrated with the AKTA Prime system (Amersham Pharmacia Biotech). The samples were loaded at 5 ml/min, and the column was washed with several column volumes of equilibration buffer. The samples were eluted in a single-step elu-

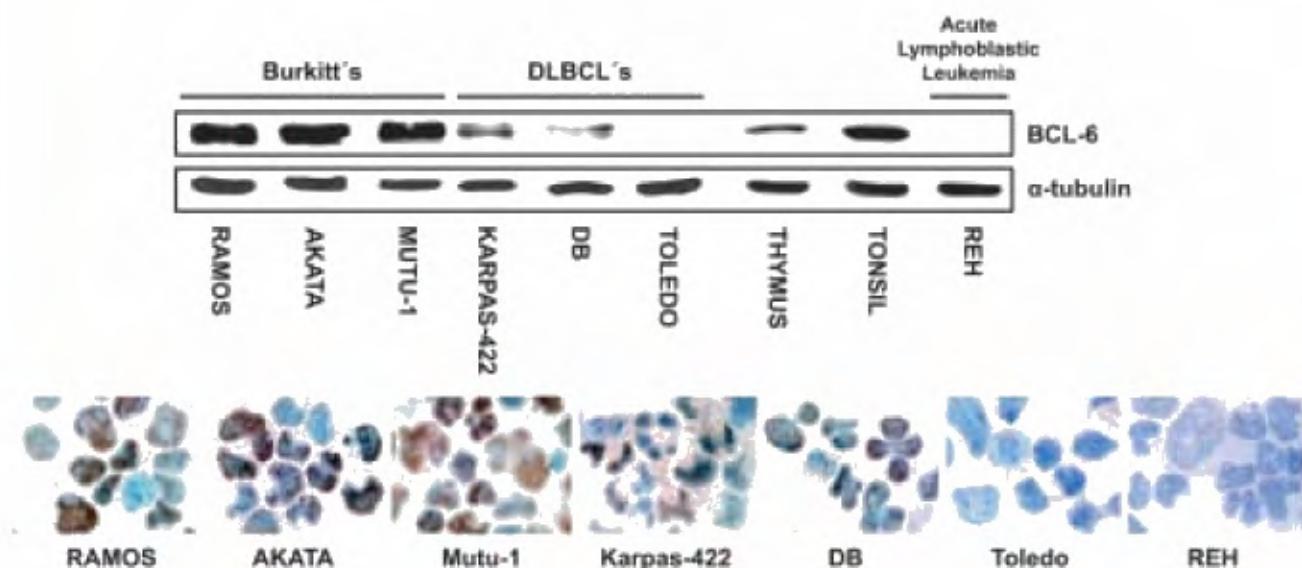


Figure 1 Correlation between Western blot (WB) and immunohistochemical staining for BCL-6 protein using the GI191E/A8 MAb. Top: WB analysis of lymphoid tissue and cell line samples for BCL-6 (upper lane) and α -tubulin (lower lane). Bottom: BCL-6 protein expression in cytocentrifuge preparations of lymphoid cell lines.

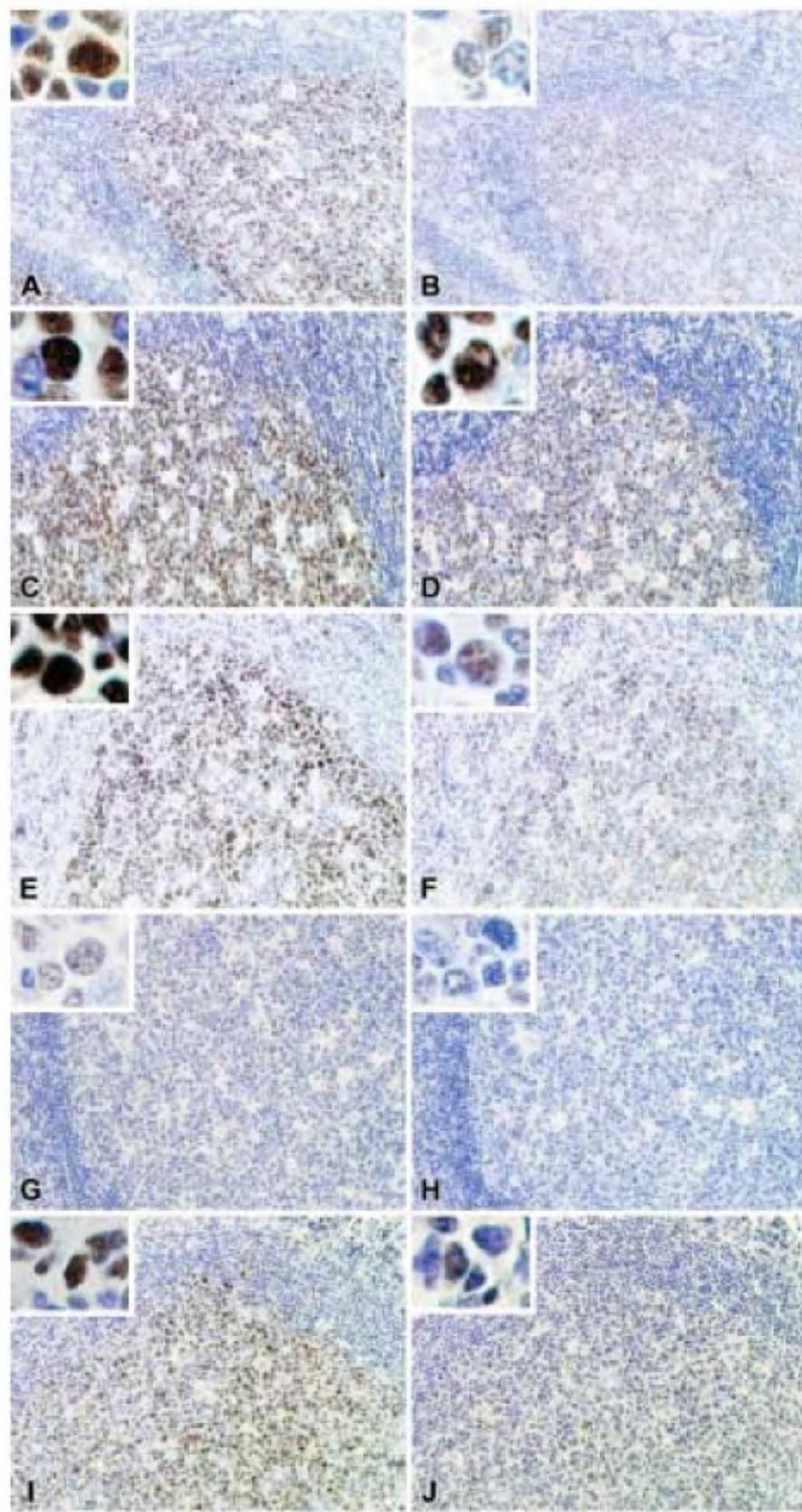


Figure 2 BCL-6 immunostaining of normal tonsil using different formalin-fixation times and B5 fixative with GI191E/A8 (A,C,E,G,I) and ST42B/H7 (B,D,F,H,J) monoclonal antibodies (MAbs). Optimal results were obtained for both antibodies in tissue sections fixed for 24 hr in formalin (C,D). GI191E/A8 MAb detects BCL-6 protein independently of fixation time and B5 fixative (A,C,E,I). On the other hand, BCL-6 ST42B/H7 immunostaining decreased drastically if the tissue sections were under- or over-fixed (12 or 48 hr) (B,F). Moreover, the use of B5 fixative (I) reduced ST42B/H7 immunostaining. After 1 week of fixation, both antibodies showed weak BCL-6 staining, especially evident in the case of the clone ST42B/H7 (G,H).

Genetic Immunization for Antibody Production

35

Table 1 Comparative assessment of antibodies and retrieval solutions

BCL-6 antibody (source)	Dilution	Citrate (pH 6.5)	Citrate (pH 6.5) + proteinase K	EDTA (pH 8)
PG-B6p (DAKO)	1:5	+	++	+
	1:10	++	++	±
	1:20	+	+	±
ST42B/H7 (CNIO)	Neat	+	++	++
	1:5	+	++	±
	1:10	±	++	-
GI191/A8 (CNIO)	1:50	+B	+B	+
	1:100	+B	+++	+
	1:200	+	++	±

+, sufficient staining; ++, good staining; +++, strong staining; ±, weak staining; -, no signal detected; B, background.

tion with 0.1 glycine-HCl (pH 2.7). IgG-containing fractions, as determined by a chromatogram, were pooled and recovered in tubes with 100 µl 1 M Tris-HCl, pH 9.0, as a safety measure to preserve the activity of labile IgGs. In this way, the final pH of the samples was approximately neutral. After sample recovery, the column was washed in several volumes of equilibration buffer. The fractions containing the purified IgG were dialyzed against PBS overnight at 4°C. The final product concentration and the number of IgG molecules were determined from the ABS280nm using a spectrophotometer.

Antibody-Affinity Assay

ELISA was performed to determine Ab affinities. Ninety-six-well microtiter plates were coated for 1 hr at 37°C with the BCL-6 protein at 5 µg/ml. The plates were saturated with 2% dry milk powder, followed by incubation with serially diluted Ab (400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56, 0.78, 0.39, and 0.2 nM). GI191E/A8 and ST42B/H7 clones were incubated in duplicate in the BCL-6-coated wells. After washing with PBS-Tween, horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse Ig (DakoCytomation) was added. The plates were washed again and developed with horseradish peroxidase substrate kit solution (Bio-Rad) for 15 min. The reaction was stopped by adding 0.5% sodium dodecyl sulfate. Optical density (OD) was measured at 405 nm.

Immunostaining Techniques

Frozen tonsil tissue sections and cytocentrifuge preparations (Erber et al. 1984) were incubated for 30 min with MAb (supernatant or mouse serum), washed in PBS, and incubated with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse Ig (diluted 1:50 in PBS) (DakoCytomation). The peroxidase reaction was developed using diaminobenzidine (DakoCytomation) for 5 min and washed with distilled wa-

ter. All sections were counterstained with hematoxylin before mounting.

Before staining paraffin-embedded sections, endogenous peroxidase was blocked, the slides were incubated for 40 min with the primary MAb, washed with PBS, and the immunodetection was performed with biotinylated anti-mouse secondary Abs (25 min), followed by peroxidase-labeled streptavidin (25 min) and diaminobenzidine chromogen as substrate. The immunostaining was performed using the Techmate 500 (Dako-Cytomation; Tucson, AZ) automatic immunostaining device. Reactives were supplied by Dako-Cytomation. Incubations either omitting the specific Ab or containing unrelated Abs were used as a control of the technique.

Analysis of BCL-6 Protein by TMAs and Quantification of BCL-6 Protein Expression

Both series of lymphomas (DLBCL and B-CLL) were processed using a Tissue Arrayer device (Beecher Instrument; Sun Prairie, WI). Briefly, all cases were histologically reviewed and the richest areas of tumoral cells were marked in the paraffin blocks. Two selected 1-mm-diameter cylinders were included for each case as previously described (Kallioniemi et al. 2001; Garcia et al. 2003). IHC was performed on these sections using the different Abs and procedures described above.

After immunostaining, TMAs were scanned and analyzed using the BLISS system (Bacus Laboratories, Inc.; Lombard, IL), which employs a three-charge-coupled device (CCD) red-green-blue (RGB) sensor optically coupled to a microscope, following the manufacturer's recommendations. Multiple ×40 images were scanned for each core, and the stored images were quantified using TMAscore v.2.0 image analysis software (Bacus Laboratories, Inc.). For scoring the level of expression of BCL-6 (percentage of immunostained area) in the DLBCL and B-CLL TMAs, the threshold values for all the quantitative measures and for the different TMAs and Abs evaluated were adjusted accordingly. All measurements were made using equal threshold values.

Survival Analyses

The impact on the prognosis of BCL-6 expression measured with both BCL-6 MAbs was estimated by OS analysis. Survival curves were plotted using the Kaplan-Meier method, and statistical significance of associations between individual variables and OS was determined using the log-rank test.

Results

The anti-BCL-6 GI191E/A8 MAb was initially validated by comparing WB data and IHC on cytocentrifuge preparations of human cell lines (Figure 1). Tissue lysates of tonsil and thymus, Burkitt's lymphoma cell lines (Ramos, AKATA, and Mutu-1), and DLBCL cell lines (KARPAS-422 and DB) reveal a clear 95-kDa band of BCL-6 protein. BCL-6 protein was not detected by WB or IHC studies in the Toledo (DLBCL) and REH (acute lymphoblastic leukemia) cell lines.

BCL-6 protein expression was then studied by IHC on paraffin-embedded tissues with the GI191E/A8 MAb

Table 2 Comparison of antibodies and fixation times

BCL-6 antibody (source)	Dilution	12 hr	24 hr	48 hr	1 week	B5
PG-B6p (DAKO)	1:10	+	++	+	-	+
ST42B/H7 (CNIO)	1:5	+	++	+	-	+
GI191/A8 (CNIO)	1:100	++	+++	++	-	++

+, sufficient staining; ++, good staining; +++, strong staining; -, no signal detected.

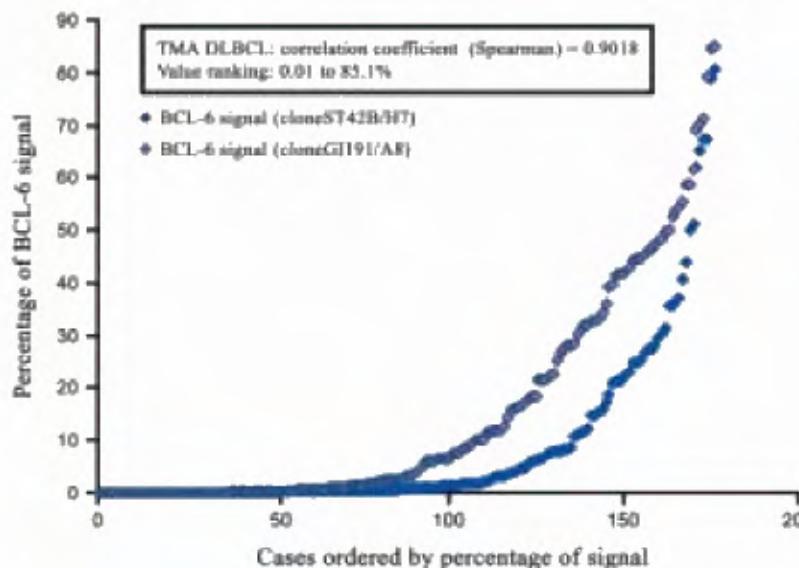


Figure 3 Comparative analysis using BLISS analysis and quantification of BCL-6 staining with GI191E/A8 and ST42B/H7 MAbs on a TMA of DLBCL cases, ordered by percentage of area with positive signal. BCL-6 values ranged from 0.01 to 85.1%, with a close correlation between the two MAbs (Spearman correlation coefficient = 0.9018). Staining intensity was very similar in those cases where BCL-6 expression was highly overexpressed or absent. BCL-6 detection with GI191E/A8 MAb was more sensitive in cases with intermediate BCL-6 expression.

and compared with other anti-BCL-6 MAbs produced by conventional means (ST42B/H7 and PG-6Bp). Positive staining of nuclei was seen in normal GC B-cells with all three MAbs. Although the specificity was similar for the three MAbs, the intensity of staining was significantly increased using the new GI191E/A8 MAb, as shown in Figure 2C.

The results of the comparison between the pressure-cooking methods of antigen retrieval using five different tonsil samples, buffers, and/or enzyme digestion with proteinase K for the anti-BCL-6 MAbs dilutions are shown in Table 1. Optimal results were obtained using citrate buffer (pH 6.5) followed by 10-min proteinase K enzyme digestion for all anti-BCL-6 MAbs tested. We found that the use of proteinase K as an additional step in the antigen retrieval method helped to decrease background staining.

The effects of formalin and B5 fixation on BCL-6 immunostaining are shown in Table 2 and Figure 2. Because the results achieved comparing the BCL-6 clones PG-B6p and ST42B/H7 were extremely similar, only the results of clone ST42B/H7 are shown in Figure 2, Figure 3, and Figure 5.

For all three MAbs tested, the best results were achieved after 24 hr of formalin fixation (Table 2 and Figures 2C–2D), the standard method used in most laboratories (Werner et al. 2000).

In the case of ST42B/H7, under- and overfixation (12 and 48 hr, respectively) drastically decreased the

BCL-6 signal, culminating in almost complete loss of signal after 1 week of fixation (Figures 2B, 2F, 2H). The B5-fixed sample showed weak BCL-6 staining (Figure 2J). In the case of GI191E/A8, under- and overfixation or B5 fixation only slightly decreased the staining, indicating that its specificity is less dependent on formalin-fixation times and type of fixative used (Figures 2A, 2E, 2G, 2I).

To evaluate the affinity of our MAbs, we performed an Ab-affinity assay using an ELISA assay. The affinities of the MAbs were estimated by reacting them with BCL-6 protein captured on the solid phase followed by OD measurement at 405 nm. Clone GI191E/A8 gave an OD 405-nm reading of 1.0 at 6.25 nM, whereas ST42B/H7 yielded a value of 1.0 at 100 nM (Table 3). Thus, the affinity of clone GI191E/A8 was ~16 times that of clone ST42B/H7.

The study of anti-BCL-6 MAbs immunostaining on tumor samples was performed using TMA analysis for DLBCL and B-CLL and analyzed using the BLISS system. As expected, all B-CLL cases staining with both MAbs were BCL-6 negative or displayed only faint nuclear expression in scattered cells (BCL-6 values ranging from 0 to 0.88%), showing that the staining was specific for BCL-6 protein and that similar epitopes were not recognized (data not shown).

The comparative study of BCL-6 expression in TMA analysis of DLBCL cases (Figure 3) revealed a close correlation between the ST42B/H7 and GI191E/A8 MAbs (Spearman correlation coefficient = 0.90). The majority of samples expressed a strong nuclear signal in most tumoral cells (values from 0.01 to 85.1%, Figure 3). Although the detection of BCL-6 protein was identical in those cases where BCL-6 was highly overexpressed or absent, in the cases where BCL-6 expression was intermediate, its detection with GI191E/A8 was more sensitive.

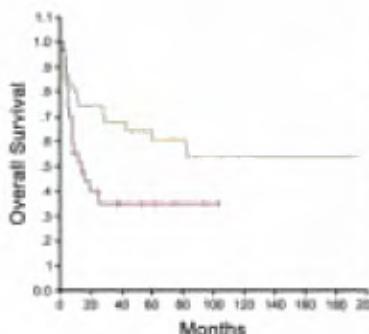
Table 3 Antibody-affinity assay by ELISA

Clone	Immunization (source)	Optical density 405 = 1
GI191/A8	GI (CNIO)	6.25 nM
ST42B/H7	Protein immunization (CNIO)	100 nM

Genetic Immunization for Antibody Production

37

Figure 4 Survival analysis (overall survival) in cases of DLBCL (excluding HIV+ cases) using the GI191E/A8 MAb. Log-rank test: $p=0.0349$.



Overall Survival Analysis (excluded HIV+ cases)				
Bcl6 GI Clone GI191/A8				
	Total	Number Events	Number Censored	Percent Censored
MEDIAN .00	36	14	22	61.11
MEDIAN 1.00	31	18	13	41.94
Overall	67	32	35	52.24

Test Statistics for Equality of Survival Distributions for MEDIAN			
	Statistic	df	Significance
Log Rank	3.69	1	0.0349

A8 MAb was more sensitive (Figure 3). Moreover, the average percentage of BCL-6 signal significantly increased when GI191E/A8 MAb was used (15.11 for GI191E/A8 vs 8.5 for ST42B/H7).

Figure 4 and Figure 5 illustrate the application of BCL-6 protein expression (using MAb clones ST42B/H7 and GI191E/A8) as an independent predictor of OS in DLBCL. Significant association of higher BCL-6 expression (as measured using GI191E/A8, Figure 4) and longer median OS times in DLBCL (log-rank test: $p=0.0349$) was found, as previously described by other groups (Lossos et al. 2001). Using ST42B/H7 MAb in the same patient group (Figure 5), there was also a direct relationship between BCL-6 expression and survival, although the association was not significant (log-rank test: $p=0.0548$). These data support the greater sensitivity and specificity of the MAb produced by genetic immunization.

Discussion

MAbs and IHC techniques on formalin-fixed, paraffin-embedded sections have become indispensable diagnostic and prognostic tools in the management of lymphoproliferative neoplasms. GI has been used mainly to obtain MAbs, which recognizes the native form of the protein but, as described here, GI can also be used as an effective alternative method for the production of MAbs for IHC on formalin-fixed, paraffin-embedded sections. This technique is much faster and less expensive, compared with conventionally produced

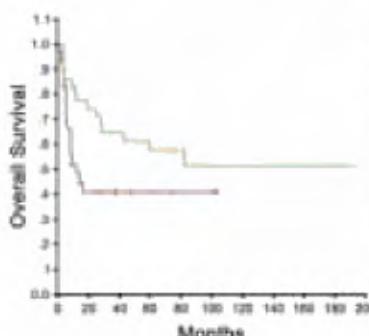
MAbs. Normally, protein production and purification take from 1 to 4 months and pose significant difficulties in some cases. GI does not require protein for immunization or for the screening procedure.

We demonstrate that GI191E/A8 presents superior sensitivity, and relative independence from factors such as fixation procedures allows better detection of BCL-6 protein in paraffin-embedded tissue. Low MAb sensitivity associated with low protein expression levels and incorrect tissue fixation procedures are the elements most commonly associated with pitfalls in routine IHC diagnosis. However, more studies with other antigens are necessary to demonstrate that GI is better suited for the production of MAbs for the detection of formalin-fixed, paraffin-embedded antigens.

MAbs are invaluable tools that have helped to extend our knowledge of biological systems for over two decades. The development of alternative methods for production of MAbs such as GI is likely to be important for meeting the increasing demand for MAbs for diagnosis, drug development, research, and therapy. GI is an important platform for the production of MAbs, allowing accurate and sensitive detection and screening of proteins in paraffin-embedded tissue samples and providing a link between genomic- and proteomic-derived data.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (BIO2000-0275-C02/01-/02, SAF2001-0060), Comunidad Autónoma de Madrid (CAM 08.1/0011/



Overall Survival Analysis (excluded HIV+ cases)				
Bcl6 GI Clone ST42B/H7				
	Total	Number Events	Number Censored	Percent Censored
MEDIAN .00	36	15	21	58.33
MEDIAN 1.00	31	17	14	45.16
Overall	67	32	35	52.24

Test Statistics for Equality of Survival Distributions for MEDIAN			
	Statistic	df	Significance
Log Rank	3.69	1	0.0548

Figure 5 Survival analysis (overall survival) in cases of DLBCL (excluding HIV+ cases) using the ST42B/H7 MAb. Log-rank test: $p=0.0548$.

2001.1), Spain. José-Francisco García is the recipient of a grant from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (FP-2001-0977), Spain.

We would like to thank Jackie Cordell, Nuffield Department of Clinical Laboratory Sciences, Oxford, for providing us with the NS-1 myeloma cell line (P3/NS1/1-Ag4-1). We also extend our appreciation to the staff of the CNIO Tumour Bank for their efficient provision of tumor simples and to Juan Fernando Martínez Leal, Carmen Blanco Aparicio, and Jesús M. Fominaya Gutiérrez of the CNIO Experimental Therapies group for advice. Further thanks are due to all members of the CNIO Animal Facility and Immunohistochemistry Unit for their technical support.

Literature Cited

- Barry MA, Barry ME, Johnston SA (1994) Production of monoclonal antibodies by genetic immunization. *Biotechniques* 16:616-618, 620
- Chambers RS, Johnston SA (2003) High-level generation of polyclonal antibodies by genetic immunization. *Nat Biotechnol* 21: 1088-1092
- Costagliola S, Rodien P, Many MC, Ludgate M, Vassart G (1998) Genetic immunization against the human thyrotropin receptor causes thyroiditis and allows production of monoclonal antibodies recognizing the native receptor. *J Immunol* 160:1458-1465
- Erber WN, Pinching AJ, Mason DY (1984) Immunocytochemical detection of T and B cell populations in routine blood smears. *Lancet* 1:1042-1046
- Falini B, Mason DY (2002) Proteins encoded by genes involved in chromosomal alterations in lymphoma and leukemia: clinical value of their detection by immunocytochemistry. *Blood* 99:409-426
- Garcia JF, Camacho FI, Morente M, Fraga M, Montalban C, Alvaro T, Bellas C, et al. (2003) Hodgkin and Reed-Sternberg cells harbor alterations in the major tumor suppressor pathways and cell-cycle checkpoints: analyses using tissue microarrays. *Blood* 101:681-689
- Gregory CD, Rowe M, Rickinson AB (1990) Different Epstein-Barr virus-B cell interactions in phenotypically distinct clones of a Burkitt's lymphoma cell line. *J Gen Virol* 71(Pt 7):1481-1495
- Gurunathan S, Klinman DM, Seder RA (2000) DNA vaccines: immunology, application, and optimization. *Annu Rev Immunol* 18:927-974
- Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, et al. (2000) The World Health Organization classification of neoplasms of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November, 1997. *Hematol J* 1:53-66
- Kallioniemi OP, Wagner U, Kononen J, Sauter G (2001) Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Hum Mol Genet* 10:657-662
- Kilpatrick KE, Cutler T, Whitehorn E, Drape RJ, Macklin MD, Witherspoon SM, Singer S, et al. (1998) Gene gun delivered DNA-based immunizations mediate rapid production of murine monoclonal antibodies to the Flt-3 receptor. *Hybridoma* 17:569-576
- Kilpatrick KE, Danger DP, Hull-Ryde EA, Dallas W (2000) High-affinity monoclonal antibodies to PED/PEA-15 generated using 5 µg of DNA. *Hybridoma* 19:297-302
- Kilpatrick KE, Kerner S, Dixon EP, Hutchins JT, Parham JH, Condray JP, Pahel G (2002) In vivo expression of a GST-fusion protein mediates the rapid generation of affinity matured monoclonal antibodies using DNA-based immunizations. *Hybrid Hybridomics* 21:237-243
- Krasemann S, Jurgens T, Bodemer W (1999) Generation of monoclonal antibodies against prion proteins with an unconventional nucleic acid-based immunization strategy. *J Biotechnol* 73:119-129
- Lossos IS, Jones CD, Warnke R, Natkunam Y, Kaizer H, Zehnder JL, Tibshirani R, et al. (2001) Expression of a single gene, BCL-6, strongly predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 98:945-951
- Mason DY, Cordell JL, Pulford KAF (1983) Production of monoclonal antibodies for immunocytochemical use. In Bullock GR, Petrusz P, eds. *Techniques in Immunocytochemistry*. London, Academic Press, 175-216
- Nagata S, Salvatore G, Pastan I (2003) DNA immunization followed by a single boost with cells: a protein-free immunization protocol for production of monoclonal antibodies against the native form of membrane proteins. *J Immunol Methods* 280:59-72
- Sanchez-Aguilera A, Delgado J, Camacho FI, Sanchez-Beato M, Sanchez L, Montalban C, Fresno MF, et al. (2004) Silencing of the p18INK4c gene by promoter hypermethylation in Reed-Sternberg cells in Hodgkin lymphomas. *Blood* 103:2351-2357
- Schmolke S, Tacke M, Schmitt U, Engel AM, Ofenloch-Haehnle B (1998) Identification of hepatitis G virus particles in human serum by E2-specific monoclonal antibodies generated by DNA immunization. *J Virol* 72:4541-4545
- Takada K, Horinouchi K, Ono Y, Aya T, Osato T, Takahashi M, Hayasaka S (1991) An Epstein-Barr virus-producer line Akata: establishment of the cell line and analysis of viral DNA. *Virus Genes* 5:147-156
- Olivieri C, Burroni D, Telford JL, Baldari CT (1996) Generation of a monoclonal antibody to a defined portion of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin by DNA immunization. *J Biotechnol* 51:191-194
- Werner M, Chott A, Fabiano A, Battifora H (2000) Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol* 24:1016-1019
- Ye BH, Cattoretti G, Shen Q, Zhang J, Hawe N, de Waard R, Leung C, et al. (1997) The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2-type inflammation. *Nat Genet* 16:161-170

Maestre L, Fontan L, Martinez-Climent JA, Garcia JF, Cigudosa JC, Roncador G. "Generation of a new monoclonal antibody against MALT1 by genetic immunization". *Hybridoma* (Larchmt). 2007 Apr;26(2):86-91.

Generation of a New Monoclonal Antibody Against MALT1 by Genetic Immunization

LORENA MAESTRE,¹ LORENA FONTAN,² JOSE ANGEL MARTINEZ-CLIMENT,²
JOSE FRANCISCO GARCIA,¹ JUAN CRUZ CIGUDOSA,^{3*} and GIOVANNA RONCADOR^{1*}

ABSTRACT

Genetic immunization (GI), which is primarily used for vaccine purposes, is a method for producing antibodies to a protein by delivering the gene encoding the protein as a eukaryotic expression vector instead of the protein itself. The mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1 (MALT1) is one of the most likely candidates for involvement in pathogenesis of MALT lymphoma and probably of multiple myelomas. In the present work we describe the production and characterization of a mouse monoclonal antibody (mAb) directed against MALT1 and the study of MALT1 protein expression in a large series of lymphomas and myeloma cell lines. The full-length coding sequence of human MALT1 was inserted into pcDNA3 vector and delivered into mouse skin using a helium gene gun. Six new mAbs against the MALT1 molecule were produced. In order to characterize and confirm the specificity of these mAbs, Western blot (WB) and immunoprecipitation (IP) analyses were performed. A new anti-MALT1 mAb was selected and tested in a large series of cell lines. These results confirm that GI is a reliable and effective alternative method for production of mAbs, allowing accurate and sensitive detection and screening of proteins by WB.

INTRODUCTION

MONOCLONAL ANTIBODIES ARE STILL unquestionably an invaluable tool for basic biomedical research, as well as for the diagnosis and treatment of diseases. In recent years, the development of new technologies such as cDNA arrays has allowed the detection of gene expression diversity among tumors and the identification of possible target molecules that could be important for our understanding of the mechanisms of cell biology and tumorigenesis. This new information has increased the need for specific antibodies to accelerate basic research into the elucidation of the function of these recently discovered proteins. Genetic immunization (GI) is an important platform for the production of mAbs against antigens with a known coding sequence. By introducing an expression vector into the animal host, the antigen is synthesized *in situ*. This provides a properly processed antigen while avoiding the need for expensive protein isolation^(1,2) or peptide synthesis. This approach has

been widely adopted, using a variety of gene delivery methods, for the production of polyclonal antibodies⁽³⁾ and mAbs.^(1,2,4-7)

In our study we used a gene gun (GG) to deliver plasmid DNA expression vector into mice. The vector was delivered using a helium discharge that propels DNA-coated gold beads into the epithelial cells of the mice.⁽⁸⁾ The antigen is expressed inside the animals' cells making it more likely to be in its desired natural folded state and thus generating antibodies capable of recognizing the native protein. In addition, mAbs obtained using GG are high affinity compared with those produced by conventional means.⁽⁹⁾

Extranodal marginal zone cell lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) type is a distinct subtype of B-cell non-Hodgkin's lymphoma.⁽¹⁰⁾ It represents about 8% of all non-Hodgkin's lymphoma and is the most common lymphoma arising at extranodal sites. MALT lymphomas exhibit various well characterized structural and numerical chromosomal abnormalities: trisomies of

¹Monoclonal Antibodies Unit, Biotechnology Programme, Spanish National Cancer Centre (CNIO), Madrid, Spain.

²Oncology Area, Molecular Oncology Laboratory, Centre for Applied Medical Research (CIMA), Pamplona, Spain.

³Molecular Cytogenetics Group, Human Cancer Genetics Programme, Spanish National Cancer Centre (CNIO), Madrid, Spain.

*JCC and GR are co-senior authors of this work.

chromosomes 3, 7, 12, and 18, t(11;18) (q21;q21), t(14;18) (q32;q21), t(1;14) (p22;q32) translocations,^(11–13) and the most recently described t(3;14) (p14.1;q32) translocation.⁽¹⁴⁾ Translocation (11;18) (q21;q21) fuses the N-terminus of the API2 gene to the C-terminus of the MALT1 gene and generates a functional chimeric API2–MALT1 product,⁽¹⁰⁾ and t(14;18) (q32;q21) results in the translocation of the MALT1 gene to the immunoglobulin heavy chain locus,^(15,16) leading to MALT1 overexpression.

MALT1 protein is a paracaspase that possesses one death domain, two adjacent immunoglobulin-like domain, and one caspase-like domain.⁽¹⁷⁾ MALT1 acts as an important regulator of adaptive immune responses *in vivo* and is essential for functional T-cell activation, proliferation, and cytokine production.^(18,19) Full-length MALT1 protein does not significantly activate NF- κ B.^(20,21) However, the fusion protein resulting from the truncation of MALT1 leads to the increased inhibition of apoptosis via NF- κ B and confers a survival benefit to MALT type lymphomas.^(10,13,17,20,22–25) Likewise, it has been postulated that gene amplification and overexpression of MALT1 may represent another mechanism of MALT1 activation in B-cell non-Hodgkin's lymphoma.^(15,26) MALT1 overexpression and/or amplification has recently been described for the first time in seven multiple myeloma cell lines,⁽²⁶⁾ which raises the possibility that this gene is involved in the development of this disease.

The data obtained so far indicate that the MALT1 gene is one of the most likely candidates for involvement in the pathogenesis of B-cell non-Hodgkin's lymphoma,⁽¹⁵⁾ more specifically in MALT lymphoma,⁽²⁷⁾ and perhaps in multiple myeloma. In order to clarify the molecular mechanism underlying the t(11;18) and t(14;18) translocations and the amplification of this gene in MALT lymphoma and myeloma, we used the DNA immunization technique to generate mouse mAbs against MALT1 protein and applied the resulting mAb in a series of lymphoma and myeloma cell lines.

MATERIALS AND METHODS

Vectors

The full-length coding region of human MALT1 gene was inserted into the pcDNA3 eukaryotic expression vector containing flag or myc tag (Invitrogen, Carlsbad, CA) under control of the CMV promoter, which is commonly used for DNA immunization, as we have previously described.⁽⁹⁾ The sequence was confirmed by DNA sequencing. The plasmid cDNAs (kindly provided by Dr. Sanchez-Izquierdo, Hospital Clínico, Valencia, Spain) were grown in the TOP 10 strain of *Escherichia coli* and purified using the JETstar 2.0 plasmid purification kit (Genycell Biotech, Granada, Spain) according to the manufacturer's instructions. In order to ensure the ability of the constructed pcDNA3-MALT1 plasmid to mediate *in vitro* expression of MALT1, HEK-293T cells (American Type Culture Collection, Rockville, MD) were transiently transfected using FuGENE transfection reagent (Roche, Mannheim, Germany). The plasmid DNA carrying the flag tag was diluted in distilled water to a concentration of 2 μ g/ μ L for the preparation of GG cartridges.

Immunization and production of mAbs

Mice were maintained in the pathogen-free Animal Care Facility Unit at the Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO). Animal experiments were performed under the experiment protocol approved by the Institutional Committee for Care and Use of Animals (CEUCA n° 001/02).

Four BALB/c mice were immunized by means of the GI technique using a GG (Bio-Rad, Hercules, CA) delivery system as previously described.⁽⁹⁾ Mice sera were tested by immunohistochemistry (IHC) on cytopsin preparations of HEK-293T cells transfected with pcDNA3-MALT1-Flag plasmid. Cells expressing MALT1-Flag recombinant protein were washed and resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) and injected (4×10^7 cells) 3 days before fusion, which was performed by conventional methods. The cell-fusion partner employed was the NS-1 myeloma cell line (P3/NS1/1-Ag4-1), and supernatants were screened using IHC on HEK-293T transfected with pcDNA3-MALT1-myc.

Cell lines

The human myeloma cell lines (U-266, RPMI8226, SK-MM-2, JJN-3, OPM-2, LP-1, NCL-H929, KARPAS620, and L-636), human B-cell lymphoma cell lines (RC-K8, SU-DHL-5, SU-DHL-8, DB, DOHH2, and KARPAS 422), human B-cell precursor leukemia cell line 380, human B-cell leukemia KARPAS 231, and the mouse cell line Ba/F3 (pro-B cell) were obtained from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Braunschweig, Germany). The human cell lines SSK41 (diffuse large B-cell lymphoma), MD901 (B-cell lymphoma), and RIVA (B-cell lymphoma) were kindly provided by Dr. Martin J Dyer (Leicester, United Kingdom).

Immunohistochemistry

The immunohistochemical procedures have been reported elsewhere.^(28,29) Cytospins were incubated for 30 min with the anti-MALT1 mAb or the rabbit anti-MALT1 polyclonal antibody H-300 raised against amino acids 525-824 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Slides were rinsed in PBS, and incubated for 30 min in 1/50 HRP goat anti-mouse or HRP goat anti-rabbit polyclonal antibody (Dako, Glostrup, Denmark), respectively. The peroxidase reaction was developed using diaminobenzidine for 5 min. The sections were counterstained with hematoxylin. Negative controls were obtained avoiding the primary antibody.

Immunoprecipitation and Western blot analysis

To extract total protein, cells were lysed in a buffer containing 50 mM Tris [tris(hydroxymethyl)aminomethane]-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Igepal (Sigma, St Louis, MO), and protease inhibitors (Roche). Lysates were incubated in a cool room on a rotary shaker for 1 h and cleared by centrifugation. For IP, 300 μ g of U-266 cell line soluble protein were incubated with 40 μ L of RON169 mAb supernatant or 2 μ g of polyclonal anti-MALT1 antibody H300 overnight at 4°C. Tagged proteins were immunoprecipitated with protein A immobilized on Sepharose (Sigma), and immunocomplexes were washed four times with HNTG buffer (20 mM Hepes [pH 7.5], 150 mM NaCl, 0.1% Triton x-100, 10% glyc-

erol). Immunoprecipitated proteins and total lysates of each cell line were denatured by heating in Laemmli sample buffer, resolved in a 7.5 or 10% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE) and transferred for 2 h onto nitrocellulose membranes. Membranes were incubated overnight with blocking solution (5% milk in PBS) and immunoblotted for 1 h at room temperature with RON169 (neat supernatant), H300 (1:100), β -actin (1:10000), and α -tubulin (1:10000) (Sigma), followed by incubation with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Dako). Finally, the blots were visualized using the ECL detection system (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, United Kingdom) in accordance with the supplier's instructions.

RESULTS

Production of anti-MALT1 antibodies

In order to generate anti-MALT1 antibodies, four mice were immunized using the GG technique, as previously described.⁽⁹⁾ After the fusion, screening was performed by IHC using HEK 293T cells transfected with pcDNA3-MALT1-myc plasmid. Six anti-MALT1 mAbs were obtained after subcloning. All of them recognized MALT1 protein by IHC in transfected cells with pcDNA3-MALT1-Flag and pcDNA3-MALT1-myc (Fig. 1A and B) and by Western blot (WB) and ELISA (data not shown). The clone RON169 was selected from the six mAbs obtained

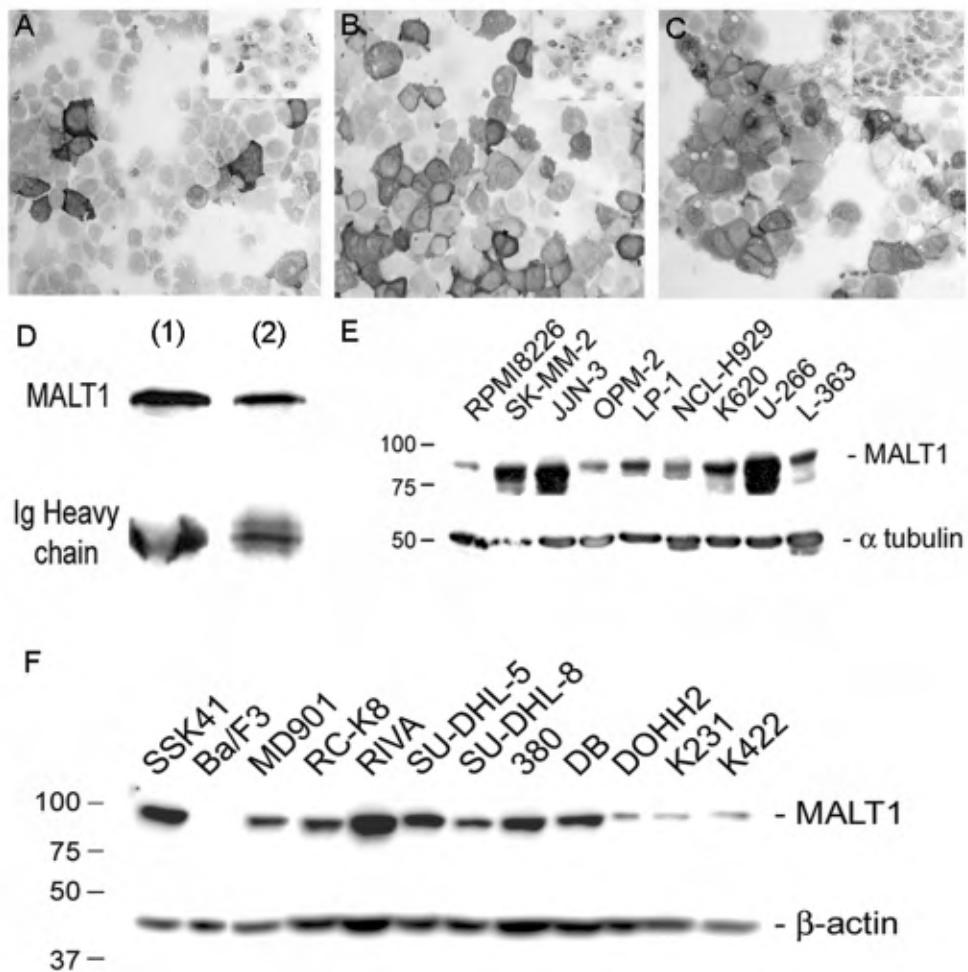


FIG. 1. Anti-MALT1 characterization by IHC, IP, and WB. RON169 immunostaining of HEK 293T cell line transfected with pcDNA3-MALT1-myc (A) and pcDNA3-MALT1-Flag (B). (C) Immunostaining of HEK 293T transfected cell line with pcDNA3-MALT1-Flag using the rabbit polyclonal antibody (H-300). The corresponding negative control is in the top right corner. (D) IP and WB analyses of U-266 cell line extract. (1) Mouse anti-MALT1 mAb (clone RON169) recognizes the MALT1 protein previously immunoprecipitated with rabbit anti-MALT1 polyclonal (H300). (2) MALT1 protein immunoprecipitated with our clone RON 169A; the product was visualized with H300 polyclonal antibody. The lower band corresponds to the immunoglobulin heavy chain. (E) WB analysis of MALT1 expression in total protein extracts of different myeloma cell lines. A 90 kDa band corresponding to MALT1 protein may be seen. Anti-tubulin was used to ensure equal loadig in the prepared fraction. (F) WB analysis of different lymphoma and leukemia cell lines using RON169 mAb. MALT1 protein is expressed at different levels in each cell line. RON169 does not recognize the mouse Ba/F3 pro-B-cell line. Anti-actin was used to confirm the quantity of cellular extracts.

NEW mAb AGAINST MALT1

89

and was found to express IgG1 mAb isotype. Anti-MALT1 polyclonal antibody H300 was used as the positive control (Fig. 1C).

Characterization of RON169

With the aim of characterizing and confirming the specificity of RON169 mAb, WB and IP studies were performed. First, two IP assays were done using the U-266 cell line extracts as the source of MALT1 protein, one with RON169, the other with the anti-MALT1 polyclonal antibody. Each IP was immunoblotted with the opposite antibody (Fig. 1D). WB analysis of IP showed that RON169 mAb and the anti-MALT1 polyclonal recognized full-length MALT1 protein in U-266 cell line extract. WB analysis revealed a clear band of 90 kDa corresponding to the expected molecular weight of MALT1 protein⁽³⁰⁾ and one band of 50 kDa of the heavy chain of the antibody employed in each IP. All the antibodies were tested on paraffin tissue sections of reactive tonsil using different buffers and antigen retrieval methods. None of these worked on paraffin sections.

RON169 mAb was tested by WB in a large series of human lymphoma, leukemia, and multiple myeloma cell lines and in one mouse pro-B-cell line. The latter cell line was employed in order to determine whether our mAb recognized mouse MALT1 protein.

Heterogeneous MALT1 expression was observed in the multiple myeloma cell lines. Abundant MALT1 protein was detected in SK-MM-2, JJN-3, U-266 and L-363, LP-1, and KARPAS 620 cell lines, while a moderate-to-low level of protein was present in RPMI 8226, OPM2, and NCL-H929 cell lines (Fig. 1E).

In the human lymphoma and leukemia cell lines employed (Fig. 1F), we also found heterogeneous levels of MALT1 protein expression. MALT1 protein was abundant in SSK41 and RIVA cell lines. MD901, RC-K8, SUDHL-5, SUDHL-8, 380, and DB cell lines showed a moderate level of MALT1 expression, while in DOHH2, KARPAS 231, and KARPAS 422 cell lines, less protein was present.

DISCUSSION

MALT lymphoma is a heterogeneous but unique pathologic form of extranodal B-cell non-Hodgkin's lymphoma and constitutes approximately 8% of all non-Hodgkin's lymphomas.⁽³¹⁾ It can be found in a variety of extranodal sites (e.g., stomach, thyroid, salivary glands, skin, lung). MALT lymphoma is thought to be the result of abnormal lymphoid cell proliferation that progressively replaces the normal B-cell population in response to either a persistent infection or an autoimmune disorder.⁽³²⁾

Since MALT1 gene is involved in the pathogenesis of human lymphomas by chromosomal rearrangements (translocation or amplification) or by its overexpression,^(15,26) our work focused on the production of high-affinity anti-MALT1 mAbs. In order to generate these potentially useful mAbs we employed the GG immunization technique, which has been used in the past with varying success to produce several monoclonal^(1,2,4-7) and polyclonal⁽³⁾ antibodies. We have recently generated a new

anti-BCL6 mAb (GI191E) by this technique, which is more sensitive and allows better detection of the protein compared with the mAbs obtained by conventional means.⁽⁹⁾

In the present study we developed six mAbs against MALT1 protein using full-length MALT1 cDNA as the antigen. We tested the ability of selected clones to recognize MALT1 protein by IHC, WB, and ELISA assays. Finally, the clone RON169 was selected from the six mAbs obtained. We used IP to confirm the specificity of our anti-MALT1 mAb. The human multiple myeloma cell line U-266, which overexpresses MALT1 protein,⁽²⁶⁾ was used successfully to precipitate MALT1 protein. The IP products obtained were immunoblotted with RON169 and a rabbit anti-MALT1 antibody, showing that RON169 mAb is able to recognize full-length MALT1 protein.

We also investigated the expression of MALT1 protein in a series of lymphoma/leukemia and myeloma cell lines by using WB. In the case of multiple myeloma cell lines, qRT-PCR and FISH analyses have recently revealed the presence of MALT1 protein in several cell lines.⁽²⁶⁾ In accordance with our WB results, we found two cell lines (SK-MM-2 and U-266) with a high level of MALT1 expression. This protein expression is consistent with the overexpression detected by qRT-PCR (U-266) and the overexpression and amplification of more than 10 copies (SK-MM-2) previously observed in these cell lines.⁽²⁶⁾ On the other hand, cell lines with a lower level of MALT1 expression, as revealed by WB (RPMI-8226, OPM-2, LP-1, KARPAS-620, and L-363), had extra copies of the MALT1 gene (half of which were overexpressed). Furthermore, the JJN-3 cell line, which exhibited a high level of the protein MALT1, as revealed by our WB analysis, did not show overexpression of MALT1 gene by qRT-PCR, which is probably indicative of other mechanisms of regulation that should be explored.

The MALT1 expression profile obtained by WB using RON169 in the lymphoma/leukemia cells is in concordance with previous genetic studies.⁽¹⁵⁾ Sanchez-Izquierdo et al. noted that SSK41 and RIVA cell lines, in which we have shown a high level of MALT1 expression using WB (Fig. 1F), presented, respectively, seven and five extra DNA copies of MALT1, in both cases within the genomic amplification of band 18q21.⁽¹⁵⁾ In that report, the MD901 cell line had three DNA copies of the MALT1 gene within the same amplification in 18q21. This is consistent with the mild MALT1 expression that we observed. Finally, the KARPAS 422 cell line, which exhibits small amounts of MALT1 protein, presented only two DNA copies of MALT1. These results confirm that MALT1 protein expression detected by WB using RON169 mAb is correlated with the amplification of the MALT1 gene previously described in many B-cell malignancy-derived cell lines.^(15,26)

In summary, this study describes the production of a new anti-MALT1 mAb (clone RON169) using the GG technique. The mAb obtained is able to identify different MALT1 expression levels by WB, so the RON169 mAb should be useful for MALT1 protein detection, isolation, and quantification and could be used for studying MALT1 function in human MALT lymphoma and myeloma. Also, we confirm that the GI assay is an effective and alternative molecular tool that can be used for the production of more specific mAbs. These antibodies could be employed to improve our understanding of the molecular pathogenesis and clinical significance of selected pro-

tein functions in lymphomas and myelomas. In the same way, this technique could be used for antigen validation of the new cDNAs obtained from lymphoma DNA array studies, facilitating the bypass between genes and proteins.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Elena Lucas, Dolly Zarzalejo, and Sara Baena for technical assistance. This study was supported by Fundacion Mutua Madrileña Automovilista (FMMA, Spain) (B137-04).

REFERENCES

- Leinonen J, Niemela P, Lovgren J, Bocchi L, Pettersson K, Nevalinna H, and Stenman UH: Characterization of monoclonal antibodies against prostate specific antigen produced by genetic immunization. *J Immunol Meth* 2004;289:157–167.
- Costagliola S, Rodien P, Many MC, Ludgate M, and Vassart G: Genetic immunization against the human thyrotropin receptor causes thyroiditis and allows production of monoclonal antibodies recognizing the native receptor. *J Immunol* 1998;160:1458–1465.
- Chambers RS and Johnston SA: High-level generation of polyclonal antibodies by genetic immunization. *Nat Biotechnol* 2003;21:1088–1092.
- Barry MA, Barry ME, and Johnston SA: Production of monoclonal antibodies by genetic immunization. *Biotechniques* 1994;16: 616–618, 620.
- Pupa SM, Forti S, Invernizzi AM, Giovanazzi R, Twal WO, Argraves WS, and Menard S: Monoclonal antibody to fibulin-1 generated by genetic immunization. *J Cell Biochem* 2003;89:647–652.
- Puttikhunt C, Kasinrerk W, Srisa-ad S, Duangchinda T, Silakate W, Moonsom S, Sittisombut N, and Malasit P: Production of anti-dengue NS1 monoclonal antibodies by DNA immunization. *J Virol Meth* 2003;109:55–61.
- Kilpatrick KE, Kerner S, Dixon EP, Hutchins JT, Parham JH, Condreay JP, and Pahel G: In vivo expression of a GST-fusion protein mediates the rapid generation of affinity matured monoclonal antibodies using DNA-based immunizations. *Hybrid Hybridomics* 2002;21:237–243.
- Johnston SA and Tang DC: Gene gun transfection of animal cells and genetic immunization. *Methods Cell Biol* 1994;43(Pt A): 353–365.
- Garcia JF, Garcia JF, Maestre L, Lucas E, Sanchez-Verde L, Romero-Chala S, Piris MA, and Roncador G: Genetic immunization: a new monoclonal antibody for the detection of BCL-6 protein in paraffin sections. *J Histochem Cytochem* 2006; 54:31–38.
- Dierlamm J, Baens M, Wlodarska I, Stefanova-Ouzounova M, Hernandez JM, Hossfeld DK, De Wolf-Peeters C, Hagemeijer A, Van den Berghe H, and Marynen P: The apoptosis inhibitor gene API2 and a novel 18q gene, MLT, are recurrently rearranged in the t(11;18)(q21;q21) associated with mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. *Blood* 1999;93:3601–3609.
- Sato Y, Akiyama Y, Tamizawa T, Shibata T, Saito K, Mori S, Kamiyama R, and Yuasa Y: Molecular characterization of the genomic breakpoint junction in the t(11;18) (q21;q21) translocation of a gastric MALT lymphoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;280:301–306.
- Ye H, Dogan A, Karran L, Willis TG, Chen L, Wlodarska I, Dyer MJ, Isaacson PG, and Du MQ: BCL10 expression in normal and neoplastic lymphoid tissue. Nuclear localization in MALT lymphoma. *Am J Pathol* 2000;157:1147–1154.
- Cavalli F, Isaacson PG, Gascoyne RD, and Zucca E: MALT lymphomas. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Prog)* 2001;241–258.
- Streubel B, Vinatzer U, Lamprecht A, Raderer M, and Chott A: T(3;14)(p14.1;q32) involving IGH and FOXP1 is a novel recurrent chromosomal aberration in MALT lymphoma. *Leukemia* 2005; 19:652–658.
- Sanchez-Izquierdo D, Buchonnet G, Siebert R, Gascoyne RD, Clement 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, and Martinez-Clement JA: MALT1 is deregulated by both chromosomal translocation and amplification in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2003;101:4539–4546.
- Streubel B, Lamprecht A, Dierlamm J, Cerroni L, Stolte M, Ott G, Raderer M, and Chott A: T(14;18)(q32;q21) involving IGH and MALT1 is a frequent chromosomal aberration in MALT lymphoma. *Blood* 2003;101:2335–2339.
- Uren AG, O'Rourke K, Aravind LA, Pisabarro MT, Seshagiri S, Koonin EV, and Dixit VM: Identification of paracaspases and meta-caspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol Cell* 2000;6:961–967.
- Ruland J, Duncan GS, Wakeham A, and Mak TW: Differential requirement for Malt1 in T and B cell antigen receptor signaling. *Immunity* 2003;19:749–758.
- Thome M: CARMA1, BCL-10 and MALT1 in lymphocyte development and activation. *Nat Rev Immunol* 2004;4:348–359.
- Izumiya K, Nakagawa M, Yonezumi M, Kasugai Y, Suzuki R, Suzuki H, Tsuzuki S, Hosokawa Y, Asaka M, and Seto M: Stability and subcellular localization of API2-MALT1 chimeric protein involved in t(11;18) (q21;q21) MALT lymphoma. *Oncogene* 2003;22:8085–8092.
- Stoffel A, Chaurushiya M, Singh B, and Levine AJ: Activation of NF-kappaB and inhibition of p53-mediated apoptosis by API2/mucosa-associated lymphoid tissue 1 fusions promote oncogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:9079–9084.
- Rueffli-Brasse AA, French DM, and Dixit VM: Regulation of NF-kappaB-dependent lymphocyte activation and development by paracaspase. *Science* 2003;302:1581–1584.
- Ho L, Davis RE, Conne B, Chappuis R, Berczy M, Mhawech P, Staudt LM, and Schwaller J: MALT1 and the API2-MALT1 fusion act between CD40 and IKK and confer NF-kappa B-dependent proliferative advantage and resistance against FAS-induced cell death in B cells. *Blood* 2005;105:2891–2899.
- Hosokawa Y: Anti-apoptotic action of API2-MALT1 fusion protein involved in t(11;18)(q21;q21) MALT lymphoma. *Apoptosis* 2005;10:25–34.
- Nakagawa M, Seto M, and Hosokawa Y: Molecular pathogenesis of MALT lymphoma: two signaling pathways underlying the antiapoptotic effect of API2-MALT1 fusion protein. *Leukemia* 2006;20:929–936.
- Largo C, Alvarez S, Saez B, Blesa D, Martin-Subero JI, Gonzalez-Garcia I, Brieva JA, Dopazo J, Siebert R, Calasanz MJ, and Cigudosa JC: Identification of overexpressed genes in frequently gained/amplified chromosome regions in multiple myeloma. *Haematologica* 2006;91:184–191.
- Akagi T, Motegi M, Tamura A, Suzuki R, Hosokawa Y, Suzuki H, Ota H, Nakamura S, Morishima Y, Taniwaki M, and Seto M: A novel gene, MALT1 at 18q21, is involved in t(11;18) (q21;q21) found in low-grade B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *Oncogene* 1999;18:5785–5794.
- Roncador G, Garcia JF, Garcia JF, Maestre L, Lucas E, Menarguez J, Ohshima K, Nakamura S, Banham AH, and Piris MA: FOXP3, a selective marker for a subset of adult T-cell leukaemia/lymphoma. *Leukemia* 2005;19:2247–2253.
- Garcia JF, Roncador G, Garcia JF, Sanz AI, Maestre L, Lucas E, Montes-Moreno S, Fernandez Victoria R, Martinez-Torrecuadrada JL, Marafioti T, Mason DY, and Piris MA: PRDM1/BLIMP-1 ex-

- pression in multiple B and T-cell lymphoma. *Haematologica* 2006; 91:467–474.
30. Ye H, Gong L, Liu H, Hamoudi RA, Shirali S, Ho L, Chott A, Streubel B, Siebert R, Gesk S, Martin-Subero JI, Radford JA, Banerjee S, Nicholson AG, Ranaldi R, Remstein ED, Gao Z, Zheng J, Isaacson PG, Dogan A, and Du MQ: MALT lymphoma with t(14;18) (q32;q21)/IGH-MALT1 is characterized by strong cytoplasmic MALT1 and BCL10 expression. *J Pathol* 2005;205:293–301.
31. Isaacson PG and Du M-Q: MALT lymphoma: from morphology to molecules. *Nat Rev Cancer* 2004;4:644–653.
32. Bertoni F and Zucca E: Delving deeper into MALT lymphoma biology. *J Clin Invest* 2006;116:22–26.

Address reprint requests to:

Lorena Maestre

Monoclonal Antibodies Unit

Biotechnology Programme

Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas

(Spanish National Cancer Centre)

C/ Melchor Fernández Almagro 3

E-28029 Madrid

Spain

E-mail: lmaestre@cnio.es

Garcia JF, Roncador G, Garcia JF, Sanz AI, Maestre L, Lucas E, Montes-Moreno S, Fernandez Victoria R, Martinez-Torrecuadrara JL, Marafioti T, Mason DY, Piris MA. “*PRDM1/BLIMP-1 expression in multiple B and T-cell lymphoma.*” **Haematologica/The Hematology Journal.** 2006 Apr; 91(4):467-74.



PRDM1/BLIMP-1 expression in multiple B and T-cell lymphoma

José-Francisco García
Giovanna Roncador
Juan-Fernando García
Ana-Isabel Sáez
Lorena Maestre
Elena Lucas
Santiago Montes-Moreno
Rebeca Fernández Victoria
Jorge L. Martínez-Torrecuadrada
Teresa Marafioti
David Y. Mason
Miguel A. Piris

Background and Objectives. The positive regulatory domain I (PRDM1) protein or BLIMP-1, belonging to the PRDM gene family of transcriptional repressors, is a key regulator of terminal differentiation in B-lymphocytes and is critical for plasma cell differentiation.

Design and Methods. Here we document the expression of PRDM1 in normal and neoplastic lymphoid cells, through the use of a monoclonal antibody that recognizes the molecule in paraffin-embedded tissue sections. A large series of B and T-cell lymphomas (679 cases) was studied, using tissue microarrays.

Results. Multiple myeloma, plasmacytoma and lymphoplasmacytic lymphoma cases (n=19) were positive. Plasmablastic lymphoma, oral mucosa-type (n=15), were also found to be positive. PRDM1 protein was expressed in some cases of B-cell neoplasia, i.e. chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma (15%), diffuse large B-cell lymphoma (43%), classical Hodgkin's lymphoma (41%) and also in T-cell lymphoma (23%).

Interpretation and Conclusions. Most B-neoplastic cells showing plasmablastic differentiation were PRDM1-positive. Unexpectedly, a subset of diffuse large B-cell lymphoma expressed PRDM1, lacked detectable plasmablastic or immunoblastic changes and displayed more aggressive behavior, with a shorter failure-free survival. In contrast to normal B-cells, diffuse large B-cell lymphoma cases with increased PRDM1 expression co-expressed BCL-6 and MUM1/IRF4, confirming that PRDM1 expression in these tumors is insufficient to drive the full genetic program associated with plasmacytic differentiation.

Key words: PRDM1, BLIMP-1, lymphoma, plasma cell, monoclonal antibody.

Haematologica 2006; 91:467-474

©2006 Ferrata Storti Foundation

From the Monoclonal Antibodies Unit, Biotechnology Program, Spanish National Cancer Centre (CNIO), Madrid, Spain (J-FG, GR, LM, EL); Molecular Pathology Program, CNIO, Madrid, Spain (J-FG, MAP); Dept. of Pathology, University Hospital, Granada, Spain (A-IS); Dept. of Pathology, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain (SM-M); Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Xeral-Cies (CHUVI), Vigo, Spain (RFV); Protein Technology Unit, Biotechnology Program, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), Madrid, Spain (JLM-T); Leukaemia Research Fund Immunodiagnostics Unit, Nuffield Department of Clinical Laboratory Sciences, John Radcliffe Hospital, Oxford, United Kingdom (TM); Department of Pathology, MD Anderson International, Madrid, Spain (J-FG).

Correspondence:
José-Francisco García Verdes-Montenegro, Monoclonal Antibodies Unit, Biotechnology Program, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (Spanish National Cancer Centre), C/ Melchor Fernández Almagro, 3. E-28029, Madrid, Spain.
E-mail: jfgarcia@cnio.es

The positive regulatory domain I (PRDM1) protein, also named PRDI-BF1 or BLIMP-1 (B lymphocyte-induced maturation protein 1) in mice, belongs to the PRDM gene family of transcriptional repressors. It is a key regulator of terminal B-cell differentiation^{1,2} and has the ability to drive activated or germinal center B cells to become antibody-secreting cells with a plasma cell phenotype^{1,3} and activate an apoptotic response in immature B cells and pre-B cells.² The study of normal tissues shows that *in vivo* expression of PRDM1/BLIMP-1 in the adult mouse is restricted to plasma cells, including (a) those formed in a primary response to either T-cell-dependent or independent antigen, (b) those formed from memory cells in a secondary response, and (c) long-lived plasma cells in the bone marrow.⁴ PRDM1/BLIMP-1 is not found in memory B-cells but is expressed in a subset (5-15%) of germinal center B-cells with a plasma cell phenotype.⁴ These findings suggest that this subset of germinal center B-cells might be committed to a plasma cell fate and that the level of PRDM1/BLIMP-1 expression may determine whether they differentiate to become immunoglobulin-secreting plasma cells or enter the memory B-cell pool.⁴ Five genes that are direct targets for PRDM1/BLIMP-1 (all of them associated with B-cell phenotype and proliferation), have been characterized to date: *c-Myc*,⁵ *MHC2TA* promoter III, responsible for regulating CIITA,^{3,6} B-cell lineage-specific activator protein (BSAP)/*PAX5*,⁷ *Spi-B*; and *Id3*.⁸ Repression of *c-Myc*, *CIITA* and *PAX5* alone is unlikely to explain the entire program of plasma cell development activated by PRDM1/BLIMP-1.⁸ Previous immunohistochemical studies of normal human lymphoid tissue have shown PRDM1 expression mainly in a small population of large B cells in the germinal center and plasma cells.⁹ PRDM1 was absent in activated extrafollicular B cells, in the majority of resting T cells, in tissue histiocytes, and in antigen-presenting dendritic cells. PRDM1 expression was also found in human B-cell lymphomas with plasma cell differentiation and in a minority of diffuse large-B cell lymphomas (DLBCL). Marginal zone lymphomas, chronic lymphocytic leukemias (B-CLL) and Hodgkin's lymphomas were reported to be largely negative.⁹ Interestingly PRDM1 expression has been found in a small population of reactive non-neoplastic T cells (CD3-positive) in B-cell lymphomas,⁹ however PRDM1 positivity in T-cell lymphomas has not been described to date. In the current study, using tissue-microarrays, we investigated the expression of PRDM1 protein in a large series of both

normal and neoplastic lymphoid tissues, using a new anti-PRDM1 monoclonal antibody that recognizes its target molecule in paraffin-embedded tissue sections. Our results reveal the value of this anti-PRDM1 monoclonal antibody for the identification and study of reactive plasma cells and plasma cell-derived neoplasms. Immunostaining for PRDM1 in paraffin-embedded tissue showed positivity not only in myeloma/plasmacytoma cases, but also in subgroups of DLBCL and in a small proportion of B-CLL/small lymphocytic lymphoma (B-CLL/SLL), classical Hodgkin's lymphoma (cHL) and T-cell lymphomas. Due to the high proportion of PRDM1-positive DLBCL, we investigated the correlation between PRDM1 expression and clinical outcome. Our observations highlight the potential value of detecting PRDM1 protein for the experimental analysis and classification of human lymphomas.

Design and Methods

Production of PRDM1 monoclonal antibody

A cDNA encoding the full-length human PRDM1 protein was kindly provided by Dr. Tom Maniatis (Harvard University, Cambridge, USA). The human *PRDM1* gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and introduced into the pDEST15 expression vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) by means of Gateway® technology. The GST-PRDM1 fusion protein was then expressed in *Escherichia coli* strain BL21 (DE3), purified by affinity chromatography on a GSTrap™ column (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) and used as an immunogen. PRDM1 monoclonal antibody (clone ROS, isotype IgG1/κ) was produced in BALB/c mice, maintained in the Animal Facility Unit of the CNIO, with methods described previously.^{10,11}

Tissue samples and preparation of tissue microarrays

All tissues were obtained from the tissue archives of the CNIO Tumor Bank. We used a Tissue Arrayer device (Beecher Instruments, Sun Prairie, WI, USA) to construct tissue microarray blocks, according to conventional protocols.^{10,12} All cases were histologically reviewed and representative areas were selected. Tissue microarrays were produced comprising samples of normal tissue (tonsil, lymph node with follicular hyperplasia, spleen, bone marrow, fetal liver, fetal thymus, thymus, brain, larynx, parotid gland, thyroid, gall bladder, liver, lung, skin, skeletal muscle, kidney, pancreas, stomach, duodenum, appendix, small and large intestine, bladder, ovary, uterus, breast, placenta, prostate and testis). Tissue microarrays were also prepared containing a total of 679 lymphomas, for all of which the diagnosis had been confirmed by central review of standard tissue sections. All biopsies had been taken prior to treatment. The histological criteria used for diagnoses of cases were those described in the World Health Organization classification.¹³ Some of these cases have been included in previous studies.^{10,14-18}

The B-cell tumors included were DLBCL (n=250), cHL (n=22), follicular lymphoma (n=115), B-CLL/SLL (n=54), mantle cell lymphoma cases (n=52), Burkitt's lymphoma (n=21), marginal zone lymphoma (splenic, extranodal and

nodal) (n=14), B-cell lymphoblastic lymphoma (3), lymphoplasmacytic lymphoma (n=3), plasmacytoma and plasma cell myeloma (n=16). The DLBCL tumors included 15 cases of the plasmablastic variant (i.e. tumors of oral mucosa type (n=19) that typically present in the oral cavity in HIV-positive and EBER-positive patients) and eight cases with distinct plasmablastic morphology (>90% of the cells were immunoblasts with plasmacytoid differentiation).

T/NK-cell neoplasms comprised peripheral T-cell lymphoma (PTCL), unspecified (n=41), anaplastic large cell lymphoma (ALCL) (n=30), mycosis fungoides/Sézary syndrome (n=8), T-cell lymphoblastic lymphoma/leukemia (n=16), enteropathy T-cell lymphoma (n=4), angioimmunoblastic T-cell lymphoma (n=18) and T/NK nasal type lymphoma (n=12).

Cell lines

Myeloma cell lines (RPMI-8226, L-363, SK-MM-2, KARPAS-640, NCI-H929, OPM-2 and LP-1) and the Burkitt's lymphoma cell line (RAJI) were obtained from the German Collection of Micro-organisms and Cell Cultures (DSMZ, Braunschweig, Germany). Cells were grown at 37°C in 5% CO₂ in RPMI-1640 medium (Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum (Sigma Chemical St. Louis, MO, USA). KARPAS-620 and NCI-H929 medium were also supplemented with interleukin-6 (20 ng/mL, PeproTech, London, UK).

Antibodies

Polyclonal anti-PRDM1 was kindly provided by Dr. Mark M. Davis, Department of Microbiology and Immunology, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, USA.¹ Other antibodies used were: BCL-6 (clone GI191E/A8, dilution 1:120,¹⁰ MUM-1/IRF4 (polyclonal antibody, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA dilution 1:200), CD10 (clone 56C6, Novocastra, Newcastle, UK, 1:10), CD138 (clone MI15, Dako-Cytomation, Glostrup, Denmark, dilution 1:50), p63 (clone VS38c, provided by Prof. David Y. Mason, dilution 1:1), CD30 (clone CON6D/B5, provided by Giovanna Roncador, dilution 1:1), CD3 (polyclonal antibody, Dako, dilution 1:100) and ALK (clone ALK1, provided by Prof. David Y. Mason, dilution 1:1). Goat anti-species-, isotype, or subclass-specific secondary antibodies, conjugated to Alexa Fluor 488 (green) and 594 (red) were obtained from Molecular Probes (Leiden, The Netherlands).

Western blotting and immunoprecipitation

Western blotting, immunoprecipitation and preparation of cytocentrifuge slides were carried out as previously described.^{10,20,21}

Immunostaining techniques

Immunohistochemical staining for PRDM1 was performed as follows: 2-4-μm-thick paraffin-embedded tissue microarray sections were cut onto Dako slides (Dako), and subsequently dewaxed, rehydrated, and then subjected to antigen retrieval by heating in 50 mM Tris (Trizma base)-2 mM EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (pH 9) in a microwave pressure cooker (A. Menarini Diagnostics, Workington, UK) at 900W for 2 minutes. The slides were cooled and treated with per-

PRDM1/BLIMP-1 expression in B and T-cell lymphomas

oxidase-blocking solution (Dako) for 5 minutes. Sections were then immunostained with PRDM1 monoclonal antibody (clone ROS) by the two-stage peroxidase-based EnVision technique (Dako)²² and then counterstained with hematoxylin and mounted. Incubations omitting the specific antibody or containing unrelated antibodies were used as controls. Immunostaining on cytocentrifuge preparations was carried out as previously described.¹⁰

Double immunoenzymatic labeling

Double immunoenzymatic labeling of paraffin sections was carried out using the EnVision peroxidase and alkaline phosphatase kits (Dako)²³ on normal tonsillar tissue. PRDM1 was immunostained in brown with the DAB substrate (Dako) and CD138 or CD3 in blue with the Vector blue alkaline phosphatase substrate kit (Vector Laboratories, Peterborough, UK).

Immunoperoxidase technique combined with immunofluorescence

Immunoperoxidase staining, combined with single or double immunofluorescence labeling, was performed on paraffin sections of normal tonsil, ALK-positive ALCL, PTCL and cHL cases, following a previously described method.^{23,24} Briefly, slides were immunostained for PRDM1 by the two-stage peroxidase-based EnVision technique, washed in phosphate-buffered saline (PBS) for up to 5 minutes and then incubated in normal human serum for up to 10 minutes before immunofluorescence labeling with antibodies p63/VS38c (red) and CD20 (green) in normal tonsil; ALK (red) and CD138 (green) in ALK-positive ALCL cases; CD3 (red) in PTCL or CD30 (green) in cHL cases. The immunofluorescence labeling was performed as previously described.^{24,25} Sections were incubated for 45 minutes at room temperature with a pair of antibodies that were either from different species or of differing immunoglobulin isotype/subclass. Sections were washed in PBS for up to 5 minutes and then incubated in the dark for 45 minutes with secondary antibodies (specific for species, isotypes, or subclass) and labeled with contrasting green and red fluorochromes (Alexa Fluor 488 and Alexa Fluor 594, dilution 1:100). The slides were washed in PBS for up to 5 minutes, and then mounted in fluorescent mounting medium (Dako) containing 1 µg/mL DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole). Slides were examined on a Nikon E800 Eclipse fluorescence microscope (Nikon, Kingston-upon-Thames, UK) equipped for epifluorescence. Fluorescence images were captured with an Axiocam charge-coupled device (CCD) camera (Zeiss, Jena, Germany) and Axiovision software (Imaging Associates, Bicester, UK), and adjusted using Photoshop software (Adobe, San Jose, CA, USA).²⁴ The immunoperoxidase image was viewed by transmitting light, and corresponding gray-scale images were inverted and pasted into the blue (or red in cHL) channel of the red-green-blue (RGB) Photoshop image. Using this technique, cells expressing PRDM1 were visualized as blue (excepted in cHL case visualized in red), whereas the immunofluorescence labeling marker was detected as green or red. In all immunostained paraffin sections, positive plasma cells were present, providing an internal positive control.

Scoring of PRDM1 expression

PRDM1 protein expression was assessed by immunohistochemistry on normal and neoplastic human tissue microarrays and on complete tissue sections when necessary. Each case was scored on a semi-quantitative basis, depending on the number of positive cells, as negative (no positive tumor cells or < 10%); weak (10% to ≤50% positive cells); and strong (>50% to 100% positive cells). The threshold selected for biological correlation and clinical analysis was 10%, on the basis that this gave good inter-observer reproducibility. Scoring was performed by four independent observers (Juan-FG, SM-M, MAP and TM).

Clinical series

Clinical data and follow-up were available for 140 DLBCL cases, including HIV-negative cases diagnosed between 1990 and 1999. Patients were treated with regimens including multi-agent chemotherapy (mainly adriamycin-based) with or without adjuvant radiotherapy and/or surgery. Data on gender, response to treatment, International Prognostic Index, and follow-up disease were collected according to standard protocols. A subgroup of these DLBCL cases had been used previously in an earlier study.¹⁴ Data on Rai score, Binet classification and follow up were available for 36 B-CLL/SLL cases, for which the first line of treatment had been chlorambucil and CHOP.¹⁵

Statistical analysis

Survival analyses, failure-free survival, disease-free survival and overall survival were analyzed by curves plotted using the Kaplan-Meier method. The statistical significance of associations between PRDM1 and survival was determined using the log rank test and taking a *p* value of < 0.05 as significant. The SPSS software (SPSS Inc. Chicago IL 1999) was used for the analyses.

Results**Validation of the PRDM1 monoclonal antibody**

The specificity of the anti- PRDM1 monoclonal antibody (clone ROS, isotype IgG1/κ) was demonstrated by western blotting analysis of lysates of tonsil, thymus and myeloma cell lines. A specific band of 97 kDa was observed in tonsil, thymus and all myeloma cell lines (Figure 1A). In five of the seven myeloma lines, SK-MM-2, KARPAS-620, NCI-H929, OPM-2 and LP-1, it was possible to detect a second band of 80 kDa corresponding to an alternative protein product, PRDM1 (Figure 1A).²⁶ Nuclei stains cytocentrifuge preparations of the cell lines analyzed were all concordant with the protein expression detected by western blotting (Figure 1C). We confirmed the specificity of clone ROS for human PRDM1 protein by using this antibody in western blotting of material that had been immunoprecipitated from tonsil lysates with the PRDM1-specific polyclonal antibody¹ or with the monoclonal antibody ROS. Both antibodies immunoprecipitated a protein with a molecular weight of 97 kDa that gave a positive western blotting reaction with the ROS antibody (Figure 1B).

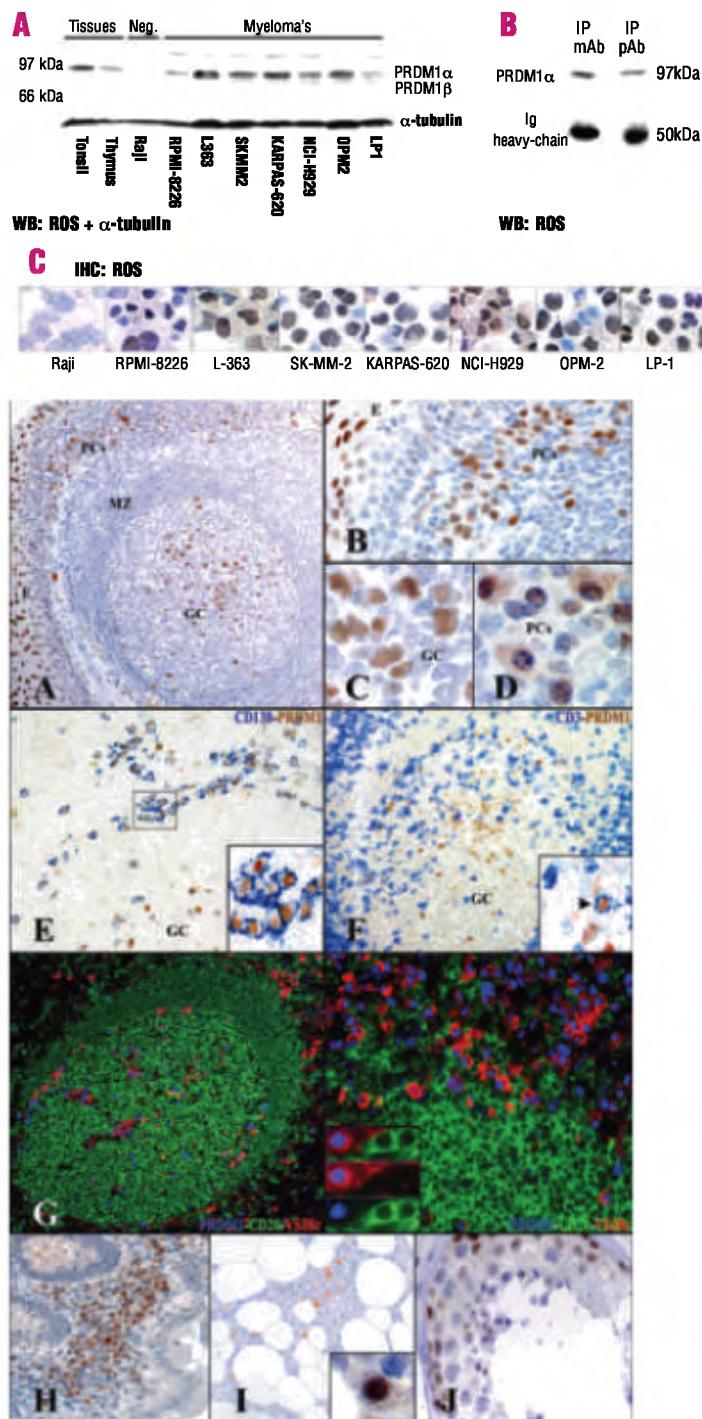


Figure 1. Biochemical characterization of the ROS monoclonal antibody. **(A)** Western blot analysis of PRDM1 expression in total protein extracts from lymphoid tissue, multiple myeloma and RAJI cell lines. Tonsil, thymus and all myeloma cell lines show a ~97 kDa band, corresponding to PRDM1 α protein. Myeloma cell lines, SK-MM-2, KARPAS-620, NCI-H929, OPM-2 and LP-1, also express an 80 kDa protein. The Burkitt's lymphoma cell line, RAJI, contains neither PRDM1 α nor PRDM1 β proteins, and was included as a negative control. **(B)** Immunoprecipitation of protein extracts from normal tonsil with the anti-PRDM1 monoclonal antibody (clone ROS, line IP mAb) and the specific polyclonal antibody (line IP pAb) followed by western blotting with the ROS monoclonal antibody, shows a ~97 kDa band. **(C)** Immunocytochemical staining for PRDM1 on cytocentrifuge preparations of cell lines using the ROS monoclonal antibody. Nuclei staining correlates with the pattern of protein expression detected by western blotting. Original magnification: 200X.

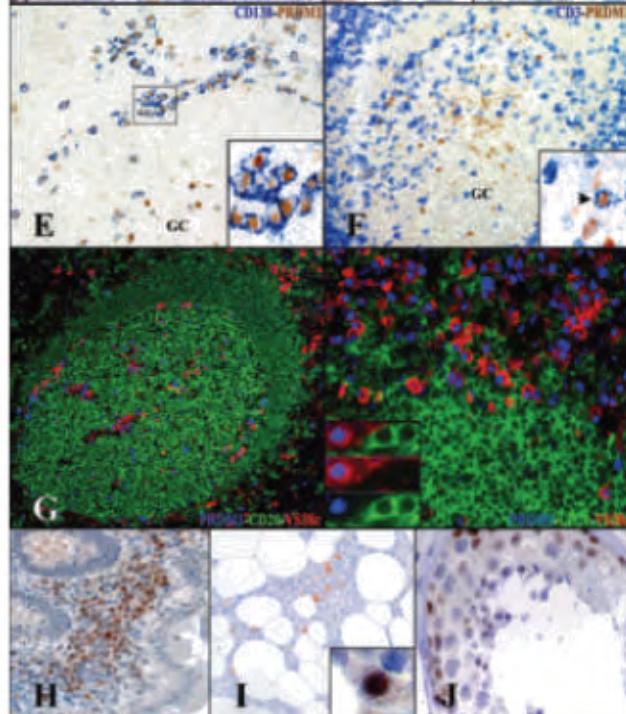


Figure 2. Immunostaining of PRDM1 protein in normal tissues. In tonsil PRDM1 protein is strongly expressed by plasma cells present in germinal centers, and in subepithelial areas (**A**, **B**, **C** and **D**). The subepithelial cells (**B** and **D**) show plasmacytoid morphology, but many positive cells in the germinal center (**C**) have a centrocyte-like morphology. Strong PRDM1 expression is also seen in the superficial layer of the epithelium (**A** and **B**). Double immunoenzymatic staining in normal tonsil reveals cells (mainly lying outside germinal centers) co-expressing PRDM1 (brown) and the plasma cell marker CD138 (blue). Furthermore a small population of PRDM1-positive cells that lack CD138 is seen in the germinal center (**E**). Within the germinal center, rare CD3-positive cells (blue staining) co-express PRDM1 (**F** and arrow). Triple staining of normal tonsil shows that PRDM1 protein (blue) is co-expressed by cells carrying the plasma cell-related antigen p63/VS38c (red). CD20-positive cells (green) are mainly PRDM1-negative (**G**). PRDM1 protein is also detected in plasma cells located in other tissues, i.e. appendix (**H**) and bone marrow (**I**). Spermatogonia and Sertoli cells in the testis express PRDM1 strongly (**J**).

PRDM1 protein expression in normal human tissues

PRDM1 protein expression in normal human tissues was analyzed on paraffin-embedded tissue sections using the anti-PRDM1 monoclonal antibody (clone ROS). As previously reported,⁹ PRDM1 protein was detected in the nucleus of multiple cell types, with the strongest intensity in B-lymphocytes and squamous epithelium (Figure 2). Single and double immunostaining of normal tonsillar tissue showed that PRDM1 was expressed in (a) plasma cells in germinal centers (CD138-positive) lying in a band

between the light and dark zones, (b) plasma cells at the periphery of the germinal center and (c) plasma cells located within and below the crypt epithelium (Figure 2A-E). PRDM1 was also expressed in some CD138-negative cells in the germinal center, mainly located in the light zone (Figure 2C and E). Triple immunostaining showed co-expression of PRDM1 protein (blue) and the plasma cell-related antigen p63/VS38c (red), while CD20-positive cells were mainly PRDM1-negative (green) (Figure 2G). PRDM1 was also expressed in plasma cells in

Table 1. Immunohistological analysis of PRDM1 protein expression in lymphoma subtypes.

Diagnosis/lymphoma subtypes	Number of cases	Reactivity neoplastic cells			Total of positive cases (%)
		Negative	Weak	Strong	
B-cell neoplasms					
B-Lymphoblastic lymphoma	3	3	0	0	0 (0%)
Chronic lymphocytic leukemia/ small lymphocytic lymphoma	54	46	8	0	8 (15%)
Mantle cell lymphoma	52	52	0	0	0 (0%)
Follicular lymphoma	115	109	4	2	6 (5%)
Burkitt's lymphoma	21	21	0	0	0 (0%)
Marginal zone lymphoma (splenic, extranodal and nodal)	14	14	0	0	0 (0%)
Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL)*	235	134	38	63	101 (43%)
Plasmablastic DLBCL (EBER+ and HIV+) of oral mucosa type	15	0	0	15	15 (100%)
Myeloma/plasmacytoma	16	0	0	16	16 (100%)
Lymphoplasmacytic lymphoma	3	0	0	3	3 (100%)
Hodgkin's disease					
Classical Hodgkin's lymphoma	22	13	8	1	9 (41%)
T-cell neoplasms					
Peripheral T-cell lymphoma	41	30	7	4	11 (27%)
Anaplastic large cell lymphoma					
ALK protein +	16	5	5	6	11 (69%)
ALK protein -	14	8	3	3	6 (43%)
T-angiomyxoblastic lymphoma	18	17	1	0	1 (6%)
T/NK nasal type lymphoma	12	11	1	0	1 (8%)
Mycosis fungoïdes/Sézary	8	8	0	0	0 (0%)
T-lymphoblastic lymphoma/ leukemia	16	16	0	0	0 (0%)
Enteropathy-type T-cell	4	4	0	0	0 (0%)
Lymphoma					
Total	679	491	75	116	188 (28%)

*Including eight selected DLBCL cases with distinct immunoblastic morphology: all eight cases (100%) showed >50% PRDM1 strong positive expression.

other organs, such as spleen, bone marrow and in the intestinal lamina propria (Figure 2H, I). Furthermore we also found a small number of T cells (CD3-positive) that expressed PRDM1 both within and outside germinal centers (Figure 2F). PRDM1 protein expression was not found in non-hematologic tissues, with the exception of squamous epithelium in different tissues. In the testis, we found PRDM1 expression in undifferentiated germ cells (spermatogonia) present in the basal compartment of the seminiferous tubule and in Sertoli cells (Figure 2J).^{27,28}

PRDM1 expression in human lymphomas

The immunostaining results on paraffin sections from 679 cases of human lymphoma are summarized in Table 1.

Non-Hodgkin's B-cell lymphoma

As expected, all plasma cell-derived neoplasms and small B-cell lymphomas with plasma cell differentiation (multiple myelomas [n=11], plasmacytomas [n=5], lymphoplasmacytic lymphomas [n=3]) showed strong PRDM1 expression (Figure 3).

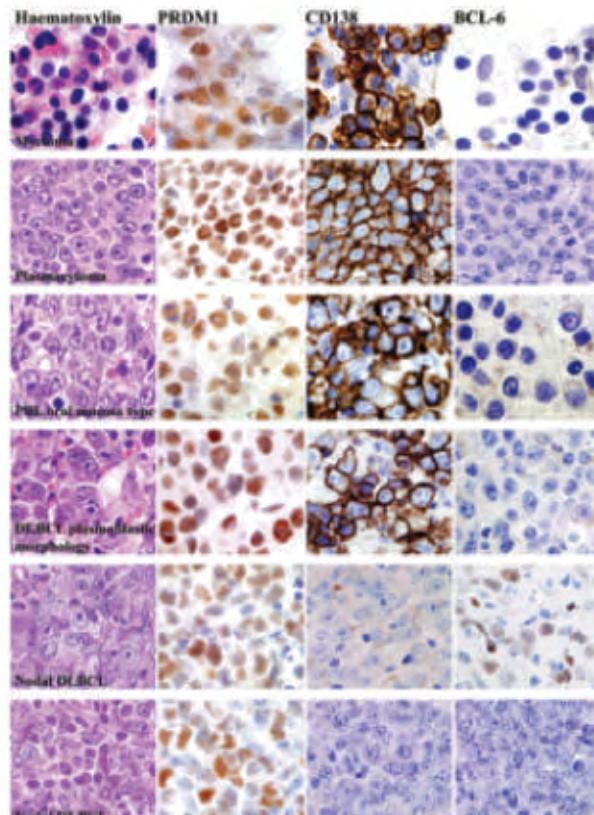


Figure 3. Immunostaining of lymphoid neoplasms for PRDM1. Representative examples of PRDM1-positive plasma cell-derived neoplasms, plasmablastic lymphoma of oral mucosa type and diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). Strong nuclear PRDM1 expression in multiple myeloma in bone marrow, in extramedullary plasmacytoma, in plasmablastic lymphoma of oral mucosa type and DLBCL with plasmablastic/immunoblastic cytological features. Note tumor cells express PRDM1 and CD138, but are BCL6-negative. A case of conventional nodal DLBCL shows strong nuclear positivity for the PRDM1 protein (tumor cells are CD138-negative and BCL6-positive). Tumor cells in a second PRDM1-positive DLBCL nodal case show strong nuclear positivity for the PRDM1 protein (and absence of CD138 and BCL-6). All stains were performed on paraffin sections using the immunoperoxidase technique.

Plasmablastic DLBCL of oral mucosa type

All 15 cases showing the characteristic clinical presentation, HIV-infection and EBER expression, considered to represent a clear-cut clinicopathologic entity, were PRDM1-positive (Figure 3).

Diffuse large B-cell lymphoma

Almost half of all cases of DLBCL (101/235) were PRDM1-positive. PRDM1 was strongly positive in 63 of the 235 cases analyzed (Figure 3), while a further 38 cases showed weaker PRDM1 expression. Eight cases of DLBCL with an immunoblastic morphology, distinct from the plasmablastic oral mucosa-type, were PRDM1-positive (Figure 3). We found MUM1/IRF4 expression in 68% of PRDM1-positive DLBCL. Among PRDM1-negative DLBCL cases, 48% expressed MUM1/IRF4. We also observed that many PRDM1-positive DLBCL cases also expressed BCL-6 protein (84%). As described by Hans *et al.*, it is possible to distinguish the germinal center-B and non-germinal center B subtypes of DLBCL using a panel of three immunostains (BCL-6, CD10 and MUM1/

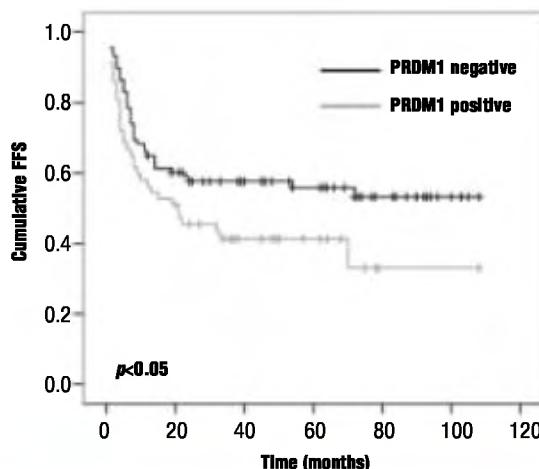


Figure 4. Kaplan-Meier analysis of failure-free survival (FFS) in DLBCL patients, grouped according to the expression of PRDM1 protein. FFS was shorter in the PRDM1-positive group (gray curve) than in the PRDM1-negative group (black curve).

IRF4).²⁹ However, we were unable to demonstrate any difference in expression of PRDM1 between germinal and non-germinal center B tumors, since PRDM1 expression was detected in just under half of the cases in both subgroups (36/81 and 42/97, respectively). We also investigated the prognostic value of PRDM1 protein expression in 146 patients with DLBCL, excluding plasmablastic DLBCL of oral mucosa type. Kaplan-Meier plots showed that the overall survival and disease-free survival of PRDM1-positive patients were not significantly different from those of PRDM1-negative cases; however when treatment failure was considered, PRDM1-positive patients had a shorter failure-free survival. This difference in the survival rate proved significant using the log rank test ($\chi^2 = 3.809$, $p < 0.05$) (Figure 4).

B-chronic lymphocytic leukemias/small lymphocytic lymphomas

A minority of cases of B-CLL/SLL (8/54) were PRDM1-positive. Most of these positive cases showed weak PRDM1 staining compared with the strong positivity of normal plasma cells or plasma cell-derived lymphomas (Figure 5). Expression of PRDM1 in B-CLL/SLL cases was not correlated with survival or IgVH mutational index.

Other non-Hodgkin's B-cell lymphomas

A small minority (6/115) of follicular lymphoma cases showed weak PRDM1 expression. In other B-cell lymphomas, i.e. B-lymphoblastic lymphoma (n=3), mantle cell lymphoma (n=52), Burkitt's lymphoma (n=21) and marginal zone lymphoma (n=14) (splenic, extranodal and nodal), PRDM1 expression was detected only in the non-neoplastic plasma cell component.

Classical Hodgkin's lymphoma

PRDM1 expression was found in a fraction (around 10%) of the nuclei of Hodgkin's and Reed Sternberg (H-RS) cells in 9 of the 22 cases of cHL analyzed (Figure 5).

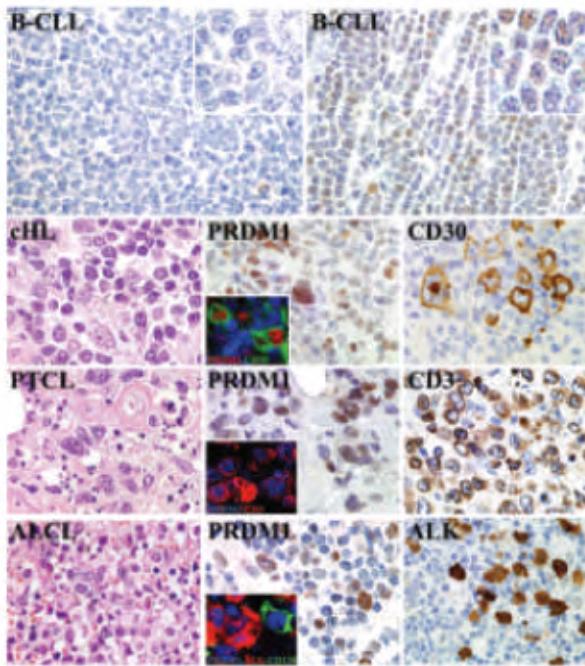


Figure 5. Immunostaining of lymphoid neoplasms for PRDM1. Representative examples of PRDM1-negative and PRDM1-positive B-chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma (B-CLL) cases. Note weak nuclear PRDM1 staining in neoplastic cells in the positive B-CLL case (seen more clearly at higher power in the inset) compared with strong staining in normal plasma cells shown in Figure 1. Representative example of classical Hodgkin's lymphoma (cHL) case with high numbers of PRDM1-positive cells. Double immunofluorescent labeling of the cHL case shows CD30-positive neoplastic cells (green) expressing PRDM1 protein (red) (inset). Representative example of PRDM1-positive peripheral T-cell lymphoma (PTCL). Double immunofluorescent labeling shows that neoplastic cells (CD3-positive, red) also express PRDM1 (green) (inset). Representative example of ALK-positive anaplastic large T-cell lymphoma (ALCL) with high numbers of PRDM1-positive cells. Triple labeling shows ALK-positive neoplastic cells (red) and also plasma cells (CD138-positive) (green) which express PRDM1 (blue) (inset).

All PRDM1-positive cHL cases were PAX5-positive and CD138-negative. Furthermore, no correlation was seen between PRDM1 expression and Epstein-Barr virus infection. The presence of PRDM1 in tumor cells was confirmed by double immunofluorescence analysis, showing PRDM1-positive nuclei in a majority of atypical CD30-positive cells. PRDM1 protein was also detected by western blotting analysis in different cHL-derived cell lines, L-540 and L428 (*data not shown*), supporting the immunohistological data on PRDM1 expression in cHL biopsies.

T/NK-cell neoplasms

As described above, nuclear PRDM1 expression in reactive lymphoid tissue was observed in less than 1% of T cells. In contrast, approximately a quarter of the T-cell neoplasms analyzed (30/129) showed PRDM1 expression (Table 1). PRDM1 expression was mainly found in PTCL (11/41, 27%) and ALCL (17/30, 57%) (Figure 5). In ALCL cases PRDM1 staining could be detected in both ALK-positive (11/16, 69%) and ALK-negative cases (6/14, 43%). The presence of PRDM1 protein in neoplastic cells was confirmed by double immunofluorescence analysis, which showed that PRDM1-positive nuclei were found in CD3-positive cells in PTCL and in the majority of

PRDM1/BLIMP-1 expression in B and T-cell lymphomas

ALK-positive cells in ALCL (shown at higher power in the insets of Figure 5).

Other types of T-cell neoplasia were negative (with the exception of one out of 18 cases of T-angioimmunoblastic lymphoma and one out of 12 cases of T/NK nasal type lymphoma).

Discussion

PRDM1 protein is a *master* regulator of B-cell terminal differentiation, with crucial roles in plasma cell differentiation.³⁰ This study provides a detailed description of the distribution of PRDM1 protein expression in a wide variety of normal and malignant human tissues. The results were obtained using a novel anti-PRDM1 monoclonal antibody (clone ROS), suitable for immunohistochemical staining of formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections and western blotting analysis. PRDM1 expression was mainly restricted to lymphohematopoietic tissues, although nuclear labeling was also observed in spermatogonia, Sertoli cells and epithelial cells. In agreement with previous data, PRDM1 protein was strongly expressed in tonsil in the nuclei of mature plasma cells in germinal centres as well as in interfollicular areas, in a subset of B cells in the germinal center and in rare T cells.⁹ The strong staining for PRDM1 protein in normal plasma cells in tonsil and in other organs, such as spleen, bone marrow or intestinal lamina propria, shows that this anti-PRDM1 monoclonal antibody represents an important tool for the identification and classification of reactive plasma cells (in combination with other plasma cell markers such as CD138, p63/VS38c, CD38 and MUM1/IRF4).^{31,32}

Using tumor tissue microarrays, we also investigated, PRDM1 expression in a large series of B and T cell lymphomas. PRDM1 was present in all lymphomas characterized by plasmacytic differentiation such as myeloma/plasmacytoma, lymphoplasmacytic lymphoma, plasmablastic lymphoma of oral mucosa type and DLBCL with immunoblastic morphology. This finding agrees with the consistent expression of PRDM1 protein in plasma cells and during plasma cell differentiation. However, we also identified aberrant PRDM1 expression in B-cell lymphomas that lack morphological features of plasmacytic differentiation (e.g. it was found to a varying degree in almost half of all cases of conventional DLBCL).

The existence of a subgroup of PRDM1-positive DLBCL cases confirms the heterogeneity of this category of lymphoma. The identification of clinical, histopathological and biological features is indispensable for the detection of different risk groups and for the therapeutic management of these lymphomas. With this in mind we investigated the possible correlation between PRDM1 and other markers commonly used for the classification of this lymphoma and outcome. Previous reports have shown that PRDM1-positive cells in normal germinal centers co-express MUM1/IRF4 in the absence of BCL-6 and that PRDM1 is required to induce plasma cell differentiation.³⁰ In our DLBCL study, we found that there are PRDM1-positive MUM1/IRF4-negative and PRDM1-negative MUM1/IRF4 positive cases. Interestingly, we also observed that many PRDM1-positive tumors also co-expressed BCL-6 protein.

These results indicate that the distribution of BCL6, MUM1/IRF4 and PRDM1 seen in normal germinal center cells is lost in DLBCL and that the regulation of these proteins is more complex than previously known.

We also investigated the relevance of PRDM1 expression in DLBCL to survival. In univariate analysis, PRDM1 expression was significantly correlated with shorter failure-free survival ($p<0.05$). PRDM1-positive patients also showed a tendency towards decreased overall and disease-free survival. These findings suggest that tumors with high PRDM1 expression have a more aggressive behavior; however, the study of a larger series of DLBCL is necessary to confirm the statistical significance of this finding and to throw further light on the role of PRDM1 in DLBCL tumorigenesis. In all of the above studies we found no difference in terms of clinical behavior or phenotype between strongly and weakly PRDM1-positive cases.

An unexpected observation was the presence of PRDM1 protein in H-RS cells in almost half of the cases of cHL. This finding is consistent with the observation that H-RS cells could express plasma cell-associated markers and may well indicate that they arise from post-germinal center cells that are beginning to progress towards the stage of terminal B-cell differentiation, a process that is accompanied by downregulation of most of the genes comprising the B-cell transcriptional program.³³ Weak PRDM1 expression was also found in a small number of SLL/CLL (15%). Although rare cases of SLL/CLL show plasmacytic differentiation,³⁴ we were unable to show that PRDM1 expression was associated with this feature. Furthermore, no correlation with CD38, Epstein-Barr virus infection, mutation index or survival was found in this group. Finally, although PRDM1 expression is predominantly associated with late-stage B-cell differentiation, we observed that PRDM1 is not B-cell specific. PRDM1 was expressed in a small percentage of non-neoplastic T cells and also in some T-cell lymphomas. Among all the T-cell lymphomas tested we found that more than half of all ALCL and about one quarter of PTCL expressed PRDM1. At this moment the significance of PRDM1 expression in T cells is unknown and further studies are needed. The results obtained in our study are generally consistent with those previously described for normal lymphoid tissue and for some lymphoma types.⁹ However, we detected PRDM1 expression in other, not previously reported lymphomas. We believe that the high affinity and specificity of our monoclonal antibody allow more accurate detection of the protein, even in those cases expressing a low level of the protein. In summary, this article describes a new monoclonal antibody, clone ROS, suitable for the detection of PRDM1 on routine samples. The analysis of a large series of lymphomas revealed that PRDM1 expression, in addition to identifying plasma cell disorders, is also present in subsets of DLBCL, cHL, B-CLL/SLL and T-cell lymphomas. The PRDM1-monoclonal antibody could, therefore, become a valuable tool for research and diagnosis of lymphomas.

Conception and design: J-FrG, GR, J-FeG, TM, DYM, MAP; provision of study material or patients: J-FrG, A-IS, JLM-T, TM, DYM, MAP; collection and assembly of data: J-FrG, -IS, SM-M, RFV; contribution to characterization of the BLIMP-1 antibody: J-FrG, LM, EL, JLM-T, TM, DYM; data analysis and interpretation: J-FrG, A-IS, RFV, TM, DYM, MAP; manuscript writing: J-FrG.

FrG; final approval of manuscript: all authors.

The authors express their gratitude to all members of the Animal Facility, the Immunohistochemistry Unit and the Tumor Bank Network of the CNIO for their excellent technical contribution and assistance. Special thanks are extended to Dolly Zarzalejo (CNIO, Spain), Lorraine Tracey (CNIO, Spain) and all members of the Leukaemia Research Fund Immunodiagnostics Unit (Oxford, UK), especially to Margaret Jones, Jacqueline L. Cordell, Sara Teldoldi and Jennifer C. Paterson. The authors declare that they have no potential conflict of interest.

This work was supported by grants from the Ministerio de

Ciencia y Tecnología (BIO2000-0275-C02/01-02, SAF2004-0060), the Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2004-04286), the Fondo de Investigaciones Sanitarias (G03/179) (Spain), the Leukaemia Research Fund (United Kingdom) (Grant nos. 04061 and 0382), and the Julian Starmer-Smith Lymphoma Fund. José Francisco García is a recipient of a grant from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (FP-2001-0977), Spain. The work was carried out in the Monoclonal Antibodies Unit (CNIO, Spain) and in the Leukaemia Research Fund Immunodiagnostics Unit, (UK).

Manuscript received November 21, 2005. Accepted January 30, 2006.

References

- Turner CA, Jr., Mack DH, Davis MM. Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells. *Cell* 1994;77:297-306.
- Messika EJ, Lu PS, Sung YJ, Yao T, Chi JT, Chien YH, et al. Differential effect of B lymphocyte-induced maturation protein (Blimp-1) expression on cell fate during B cell development. *J Exp Med* 1998; 188:515-25.
- Piskurich JF, Lin KI, Lin Y, Wang Y, Ting JP, Calame K. BLIMP-1 mediates extinction of major histocompatibility class II transactivator expression in plasma cells. *Nat Immunol* 2000;1:526-32.
- Angelin-Duclos C, Cattoretti G, Lin KI, Calame K. Commitment of B lymphocytes to a plasma cell fate is associated with Blimp-1 expression in vivo. *J Immunol* 2000;165:5462-71.
- Lin Y, Wong K, Calame K. Repression of c-myc transcription by Blimp-1, an inducer of terminal B cell differentiation. *Science* 1997;276:596-9.
- Ghosh N, Gyory I, Wright G, Wood J, Wright KL. Positive regulatory domain I binding factor 1 silences class II transactivator expression in multiple myeloma cells. *J Biol Chem* 2001;276:15264-8.
- Lin KI, Angelin-Duclos C, Kuo TC, Calame K. Blimp-1-dependent repression of Pax-5 is required for differentiation of B cells to immunoglobulin M-secreting plasma cells. *Mol Cell Biol* 2002;22:4771-80.
- Shaffer AL, Lin KI, Kuo TC, Yu X, Hurt EM, Rosenwald A, et al. Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity* 2002; 17:51-62.
- Cattoretti G, Angelin-Duclos C, Shakhnovich R, Zhou H, Wang D, Alobeid B. PRDM1/Blimp-1 is expressed in human B-lymphocytes committed to the plasma cell lineage. *J Pathol* 2005; 206:76-86.
- García JF, Maestre L, Lucas E, Sanchez-Verde L, Romero-Chala S, Piris MA, et al. Genetic immunization: a new monoclonal antibody for the detection of BCL-6 protein in paraffin sections. *J Histochem Cytochem* 2006;54:31-8.
- Roncador G, Brown PJ, Maestre L, Hue S, Martinez-Torrecuadrada JL, Ling KL, et al. Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells at the single-cell level. *Eur J Immunol* 2005;35:1681-91.
- Kallioniemi OP, Wagner U, Kononen J, Sauter G. Tissue microarray technology for high-throughput molecular pro-
- iling of cancer. *Hum Mol Genet* 2001; 10:657-62.
- Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Fladrup G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, et al. The World Health Organization classification of neoplasms of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November, 1997. *Hematol J* 2000;1:53-66.
- Saez AI, Saez AJ, Artiga MJ, Perez-Rosado A, Camacho FI, Diez A, et al. Building an outcome predictor model for diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Pathol* 2004;164:613-22.
- Rodriguez A, Martinez N, Camacho FI, Ruiz-Ballesteros E, Algara P, Garcia JF, et al. Variability in the degree of expression of phosphorylated IkBα in chronic lymphocytic leukemia cases with nodal involvement. *Clin Cancer Res* 2004;10:6796-806.
- Garcia JF, Camacho FI, Morente M, Fraga M, Montalban C, Alvaro T, et al. Hodgkin and Reed-Sternberg cells harbor alterations in the major tumor suppressor pathways and cell-cycle checkpoints: analyses using tissue microarrays. *Blood* 2003;101:581-9.
- Camacho FI, Garcia JF, Cigudosa JC, Mollejo M, Algara P, Ruiz-Ballesteros E, et al. Aberrant Bcl6 protein expression in mantle cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* 2004;28:1051-6.
- Martinez-Delgado B, Cuadros M, Honrado E, Ruiz de la Parte A, Roncador G, Alves J, et al. Differential expression of NF-κB pathway genes among peripheral T-cell lymphomas. *Leukemia* 2005;19:2254-63.
- Colomo L, Loong F, Rives S, Pittaluga S, Martinez A, Lopez-Guillermo A, et al. Diffuse large B-cell lymphomas with plasmablastic differentiation represent a heterogeneous group of disease entities. *Am J Surg Pathol* 2004;28:736-47.
- Garcia JF, Villuendas R, Sanchez-Beato M, Sanchez-Aguilera A, Sanchez L, Prieto I, et al. Nucleolar p14(ARF) overexpression in Reed-Sternberg cells in Hodgkin's lymphoma: absence of p14(ARF)/Hdm2 complexes is associated with expression of alternatively spliced Hdm2 transcripts. *Am J Pathol* 2002; 160:569-78.
- Erber WN, Finching AJ, Mason DY. Immunocytochemical detection of T and B cell populations in routine blood smears. *Lancet* 1984;1:1042-6.
- Sabattini E, Bisgaard K, Ascani S, Pojet S, Piccioli M, Ceccarelli C, et al. The EnVision++ system: a new immunohistochemical method for diagnostics and research. Critical comparison with the APAAP, ChemMate, CSA, LABC, and SABC techniques. *J Clin Pathol* 1998; 51:506-11.
- Marafioti T, Jones M, Facchetti F, Diss TC, Du MQ, Isaacson PG, et al. Phenotype and genotype of interfollicular large B cells, a subpopulation of lymphocytes often with dendritic morphology. *Blood* 2003;102:2868-76.
- Gellrich S, Ventura R, Jones M, Tan SY, Mason DY. Immunofluorescent and FISH analysis of skin biopsies. *Am J Dermatopathol* 2004;26:242-7.
- Mason DY, Micklem K, Jones M. Double immunofluorescence labelling of routinely processed paraffin sections. *J Pathol* 2000;191:452-61.
- Gyory I, Fejer G, Ghosh N, Seto E, Wright KL. Identification of a functionally impaired positive regulatory domain I binding factor 1 transcription repressor in myeloma cell lines. *J Immunol* 2003;170:3125-33.
- Saitou M, Payer B, O'Carroll D, Ohinata Y, Surani MA. Blimp1 and the emergence of the germ line during development in the mouse. *Cell Cycle* 2005;4:1736-40.
- Ohinata Y, Payer B, O'Carroll D, Ancelin K, Ono Y, Sano M, et al. Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. *Nature* 2005;436:207-13.
- Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 2004; 103:275-82.
- Shapiro-Shelef M, Calame K. Regulation of plasma-cell development. *Nat Rev Immunol* 2005;5:230-42.
- Medina F, Segundo C, Campos-Caro A, Gonzalez-Garcia I, Brieva JA. The heterogeneity shown by human plasma cells from tonsil, blood, and bone marrow reveals graded stages of increasing maturity, but local profiles of adhesion molecule expression. *Blood* 2002; 99: 2154-61.
- Tedoldi S, Paterson JC, Hansmann ML, Natkunam Y, Rudiger T, Angelisova P, et al. Transmembrane adaptor molecules: a new category of lymphoid cell markers. *Blood* 2005;107:213-21.
- Re D, Kuppers R, Diehl V. Molecular pathogenesis of Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2005;23:6379-86.
- Evans HL, Polski JM, Deshpande V, Dunphy CH. CD5+ true SLL/CLL with plasmacytic differentiation and an unusual 1p36 translocation: case report and review of the literature. *Leuk Lymphoma* 2000;39:625-32.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

LA INMUNIZACIÓN GENÉTICA APLICADA A LA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES PARA LA DETECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS BCL6 Y MALT1.

La inmunización genética es una técnica utilizada principalmente para producir respuestas inmunes dirigidas hacia la forma nativa de una proteína de interés. Esta técnica ha sido intensamente investigada en el desarrollo de vacunas de ADN para combatir patógenos y enfermedades infecciosas (79). Varias modalidades de esta técnica de inmunización (*Gene Gun*, e intramuscular) han sido utilizadas para generar respuestas inmunes frente a proteínas de diferentes tipos (transmembrana simples y compuestas, intracelulares, toxinas bacterianas, lipoproteínas de parásitos y virales) (79). Por todo ello, se considera la inmunización genética una alternativa frente a la inmunización convencional con proteína o péptidos. Sin embargo, hasta la fecha, su aplicación en la producción de anticuerpos monoclonales para el diagnóstico ha sido muy limitada y poco desarrollada, como se refleja en el escaso número de publicaciones a este respecto (88, 93, 94, 96).

El hecho de que la inmunización genética emplee como inmunógeno el vector que expresa la proteína de interés, le confiere múltiples beneficios en comparación con las técnicas convencionales. Entre estos beneficios destaca su utilidad en aquellos casos donde la proteína es difícil de expresar o purificar por métodos clásicos de producción de proteínas recombinantes. Esto es particularmente frecuente con las proteínas asociadas a membrana, como los receptores de membrana o los canales de iones. También es un método de inmunización alternativo en aquellas situaciones donde el gen ha sido identificado, pero la proteína todavía es desconocida. Adicionalmente, permite generar anticuerpos específicos frente a las conformaciones nativas de las proteínas, con sus estructuras secundaria y terciaria intactas, lo que es de vital importancia cuando se requiere generar anticuerpos monoclonales frente a dominios funcionales de las proteínas. Hay que tener en cuenta que estas estructuras normalmente son muy sensibles y tienden a perderse durante la producción *in vitro* de las proteínas (79).

La inmunización genética posee además una mayor flexibilidad en el diseño del inmunógeno debido a que se pueden seleccionar regiones específicas de la secuencia de ADN que sean de interés. Adicionalmente esta metodología supone un abaratamiento en el proceso de producción de anticuerpos monoclonales por el hecho de no necesitar las proteínas purificadas ni en las fases de inmunización ni en el cribado de los hibridomas.

En la bibliografía pueden encontrarse diferentes esquemas de inmunización genética para la producción de anticuerpos monoclonales en ratones. Las principales modificaciones que se pueden realizar para el éxito de este tipo de inmunización son: a) la metodología de inmunización genética (*Gene Gun* o intramuscular), b) el esquema de inmunización (inmunizaciones repetidas y sucesivas en un periodo corto de tiempo o un esquema convencional similar al de la inmunización con proteínas) y c) la inmunización final del ratón, previa a la extracción de las células B del bazo (únicamente con inmunización genética o con una inmunización intraperitoneal adicional con las células transfectadas que expresan la proteína de interés).

En nuestra experiencia, la inmunización mediante *Gene Gun* resultó más efectiva que la intramuscular en la producción de anticuerpos monoclonales. Esta técnica requirió únicamente unos pocos microgramos para desarrollar la respuesta inmune, medida por titulación del suero. Además, el *Gene Gun* permitía disponer de forma sencilla del inmunógeno para realizar nuevas rondas de inmunización, siendo los cartuchos con el plásmido de ADN muy fáciles de conservar y almacenar. Destacar que además, la inmunización genética vía *Gene Gun* no provocó lesiones ni daños en los ratones por lo que se evita el sufrimiento del animal.

El esquema de inmunización consistió en realizar 5 inmunizaciones en la zona inguino-abdominal, cada 14 días, tomándose muestras de suero tras 40 y 70 días de la primera inmunización. Con este esquema, los ratones inmunizados desarrollaron una muy buena respuesta inmune frente al antígeno. Para la generación de anticuerpos de alta especificidad frente a BCL6 en ratones se requirió, al igual que en la inmunización convencional con proteína, un período de tiempo prolongado e intervalos de unos 14 días de descanso entre inmunizaciones. Este fue el esquema elegido en la presente Tesis Doctoral para la producción de los anticuerpos monoclonales frente a las proteínas BCL6 y MALT1.

Por otra parte, para la producción de anticuerpos monoclonales se requiere la disponibilidad de muchas células B activadas específicas del antígeno en los órganos linfoides, concretamente en el bazo. Estas células son clave para la fase final de fusión y generación de los hibridomas productores de anticuerpos (89). En los métodos tradicionales de inmunización proteica, esto se consigue mediante una inmunización final intravenosa o intraperitoneal 3 días antes de la fusión. Este mismo procedimiento de inmunización final del animal es igualmente necesario para la inmunización con ADN, siendo uno de los factores más importantes para garantizar la producción de un elevado número de hibridomas (79). Diferentes estudios han demostrado que si únicamente se realiza una inmunización genética final, se obtiene una muy

baja eficiencia en la generación de hibridomas positivos (88, 90). Este problema se solventó para la producción de anticuerpos monoclonales frente a BCL6 y MALT1 con una última inmunización con células transfectadas con el plásmido que expresaban las proteínas de interés. Gracias a este refuerzo, la activación de los linfocitos productores de anticuerpos en el animal inmunizado fue mucho mayor y, por tanto, la generación de hibridomas fue eficiente.

En la presente Tesis Doctoral se describe un protocolo de inmunización genética vía *Gene Gun* para su aplicación como un método alternativo, rápido y viable para la inmunización de ratones con el objetivo de producir anticuerpos monoclonales que tengan aplicación en la rutina diagnóstica. Este protocolo se basa en la inmunización genética mediante *Gene Gun*, con unos períodos de descanso de unos 14 días y, tras 5 inmunizaciones y una inmunización final con células transfectadas que expresan la proteína de interés. Su utilización permitió desarrollar los anticuerpos monoclonales murinos específicos frente a las proteínas: BCL6 y MALT1.

El gen BCL6 codifica para un represor transcripcional de células B de CG que interviene en la activación, supervivencia y diferenciación de las células B y en la formación y funcionamiento de los CGs. Se expresa en todas las neoplasias de células B derivadas del CG como el linfoma de Burkitt, los linfomas foliculares y el LDCBG. Este patrón de expresión hace que los anticuerpos monoclonales frente a la proteína BCL6 se utilicen para diagnosticar y clasificar las neoplasias de células B derivadas del CG.

Como se describe en el primer artículo de la presente tesis, se generaron dos anticuerpos monoclonales anti-BCL6 mediante diferentes técnicas de inmunización: el clon ST42B/H7, producido mediante inmunización con la proteína recombinante GST-BCL6 (sintetizada en bacterias y posteriormente purificada) y el clon GI191E/A8, producido mediante inmunización genética vía *Gene Gun* con el vector p-CMV-BCL6.

Ambos anticuerpos fueron inicialmente validados por WB y por IHQ en preparaciones de líneas celulares y en tejidos linfoides reactivos (amígdala y timo). Tal y como se muestra en la Figura 1 del primer artículo, por WB se detectó una banda específica de 95 kDa correspondiente al peso molecular de BCL6 en los lisados de amígdala, de timo y de las líneas celulares derivadas de linfoma de Burkitt (Ramos, AKATA, and Mutu-1) y LDCBG (KARPAS-422 y DB). Se observó una correlación perfecta entre la detección de la proteína BCL6 por WB y la detección de BCL6 por IHQ en los citospines de las mismas líneas celulares utilizadas en el WB. Como era de esperar, la proteína BCL6 no se detectó ni por WB ni por IHQ en la línea celular derivada de leucemia linfoblástica aguda (REH) ni en la derivada de LDCBG (Toledo).

Para la validación de los anticuerpos ST42B/H7 y GI191E/A8 en IHQ en tejido parafinado, se utilizaron cortes de 5 muestras de amígdalas tratadas con tres tampones diferentes de desenmascaramiento antigénico (Citrato, Citrato con proteinasa-K y EDTA). El anticuerpo anti-BCL6 (clon PG-B6p), comúnmente utilizado para el diagnóstico diferencial de los linfomas B y producido por inmunización convencional, se utilizó como control positivo. La proteína BCL6 se detectó específicamente en el núcleo de las células B del CG, siendo el patrón de expresión con los tres anticuerpos monoclonales idéntico. Sin embargo, es de destacar que la intensidad del marcaje por IHQ con el clon GI191E/A8 era significativamente más alta.

Entre los principales problemas que dificultan el diagnóstico rutinario por IHQ de BCL6 en secciones de tejido fijado en formol y embebido en parafina destacan: la baja sensibilidad de los anticuerpos utilizados, que no detectan bajos niveles de expresión proteica, y el uso de prácticas erróneas en la fijación del tejido.

Para evaluar como afectaba la fijación a la calidad diagnóstica de los nuevos anticuerpos monoclonales anti-BCL6 producidos en la presente Tesis Doctoral, se realizó un estudio comparativo por IHQ con amígdalas procesadas con diferentes tiempos de fijación (12, 24, 48 horas y una semana) y dos tipos de fijador (formol tamponado o B5). De acuerdo a las recomendaciones sobre fijación, y como era de esperar; los mejores resultados en la IHQ de BCL6 se observaron con los tres anticuerpos monoclonales en la amígdala fijada en formol durante 24 horas.

Los dos anticuerpos producidos por inmunización convencional (clones ST42B/H7 y PG-B6p) tenían las muestras de forma muy similar y vieron afectada de manera significativa la detección de la proteína BCL6, tanto por defecto como por exceso en el tiempo de fijación, así como, por la fijación con B5. Se observó la pérdida total de la señal con ambos anticuerpos en las amígdalas fijadas durante una semana. Por el contrario, en el caso del anticuerpo producido por inmunización genética, clon GI191E/A8, el defecto o exceso en la fijación con formol o la fijación con B5 sólo redujo la intensidad del marcaje de BCL6, indicando que su especificidad es menos dependiente del tiempo de fijación o del fijador utilizado (ver Figura 2 del primer artículo).

Los resultados obtenidos indican que el uso del anticuerpo monoclonal anti-BCL6 producido por inmunización genética sería de gran utilidad para los laboratorios de anatomía

patológica donde pequeñas variaciones en los procesos de fijación no afectarían de manera significativa a la correcta detección de la proteína BCL6 en cortes de parafina.

Para valorar la aplicación diagnóstica de los nuevos anticuerpos anti-BCL6 producidos, se realizó un estudio comparativo de la expresión de BCL6 por IHQ con ambos anticuerpos, GI191E/A8 y ST42B/H7, en 89 casos de LDCBG y 24 casos de LLC-B. Para que la valoración de la IHQ de BCL6 en estas neoplasias linfoides fuese objetiva y reproducible, con independencia del observador, se utilizó el sistema BLISS, que permite la valoración digital automatizada y la cuantificación de marcaje por IHQ.

La cuantificación de la expresión de BCL6 en los casos de LDCBG fue idéntica en aquellos casos con BCL6 altamente expresado o ausente (extremos), sin embargo, en los casos con expresión intermedia, la detección de la proteína BCL6 con el clon GI191E/A8 fue superior. Como era de esperar, no se observó expresión de BCL6 en los casos de LLC-B con ninguno de los anticuerpos utilizados. Estos resultados indican una mayor sensibilidad del clon producido por inmunización genética para la detección de BCL6 por IHQ en muestras tumorales de tejido fijado en formol e incluidos en parafina (Figura 3 del artículo 1).

Finalmente se estudió si, esta menor dependencia de condiciones óptimas de fijación y la mayor sensibilidad del clon GI191E/A8, pudiera mejorar la detección de BLC6 y el valor pronóstico en pacientes con LDCBG. Los resultados en esta serie indican de manera significativa que la determinación de BCL6 por IHQ con el clon producido por inmunización genética es un factor predictivo independiente de supervivencia global en LDCBG ($p=0,035$). Esta conclusión no se podía obtener de manera significativa con el clon ST42B/H7 producido por inmunización convencional ($p=0,054$) (Figuras 4 y 5 del artículo 1) probablemente afectado por la menor sensibilidad y dependencia de condiciones óptimas de fijación del tejido.

Por todo los resultados obtenidos y como conclusión final del primer artículo, indicar que el anticuerpo producido por inmunización genética vía *Gene Gun* (clon GI191E/A8) demostró importantes ventajas competitivas frente a los clones ST42B/H7 y PG-B6p, destacando la mayor sensibilidad, independencia de factores externos como la fijación y una mejor detección de la expresión de BCL6 por IHQ. Estos resultados convierten al anticuerpo anti-BCL6, clon GI191E/A8, en una herramienta de interés para el diagnóstico diferencial de los linfomas.

Tras confirmar la efectividad y la viabilidad del procedimiento empleado de inmunización genética (*Gene Gun*) para producir el anticuerpo monoclonal de calidad frente a BCL6, se aplicó este mismo protocolo de inmunización para generar anticuerpos monoclonales frente a la proteína MALT1.

El gen *MALT1* está involucrado en la patogénesis de diferentes neoplasias hematológicas por reorganización cromosómica (translocaciones o amplificaciones) o sobreexpresión (109, 110).

Los linfomas MALT son un tipo de linfoma extranodular de células B que constituye aproximadamente el 8% de todos los LNH (111). Puede encontrarse en una gran variedad de localizaciones extraganglionares (por ejemplo, estómago, tiroides, glándulas salivares, piel y pulmón). Se cree que el linfoma MALT es consecuencia de una proliferación anómala de células linfoides que progresivamente reemplazan la población normal de células B en respuesta a una infección persistente o a un trastorno autoinmune (112).

Los estadios avanzados de los linfomas MALT se caracterizan por translocaciones genéticas específicas que conllevan a la activación del gen *MALT1* o a la expresión de la proteína de fusión API2-MALT1, que se encuentra activa de forma constitutiva y sin necesidad de la activación por BCR (113). Análisis mediante RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR) y FISH han identificado en varias líneas celulares de MM y de leucemia linfoblástica aguda de células B (LLA-B) niveles elevados de expresión del gen *MALT1* por un incremento en el número de copias génicas (110, 114).

En la presente Tesis Doctoral se procedió a la producción de un anticuerpo monoclonal de alta afinidad anti-MALT1. Para ello se empleó, de forma similar a la técnica de inmunización genética empleada para generar el anticuerpo anti-BCL6, la técnica *Gene Gun* con pistola de helio. El inmunógeno empleado fue un vector pcDNA3 en el que se insertó la secuencia codificadora completa de la proteína humana MALT1. El proceso incluyó una inmunización final, 3 días antes de la fusión, con células HEK293T transfectadas con el pcDNA3-MALT1-Flag.

Se obtuvieron 6 anticuerpos monoclonales que se caracterizaron y validaron mediante IP, ELISA y WB. Finalmente se escogió el anticuerpo monoclonal proveniente del clon RON169 debido a su mayor especificidad en la detección de la proteína MALT1.

Para confirmar la especificidad del anticuerpo RON169, se realizó la IP de la proteína MALT1 de la línea celular humana de MM, U-266, que sobre-expresa la proteína MALT1 (110). El producto de la IP se empleó para la técnica de WB y se identificó mediante el uso del anticuerpo RON169 y un anticuerpo comercial anti-MALT1 generado en conejo (Santa Cruz; referencia sc-28246). El resultado mostró que el anticuerpo monoclonal RON196 detectaba una banda específica de 90 kDa en la línea de MM U-266, confirmando su capacidad de reconocer específicamente la proteína MALT1 completa (Figura 1D del artículo 2).

Para confirmar la especificidad del anticuerpo, investigamos la expresión de la proteína MALT1 en una serie de líneas celulares de linfoma, leucemia y MM mediante WB. Como puede observarse en la Figura 1E del artículo 2, las líneas celulares de MM (U-266 y SK-MM2) mostraron una expresión elevada de MALT1, en concordancia con la sobreexpresión determinada por qRT-PCR (U-266) y la sobreexpresión y amplificación de más de 10 copias del gen (SK-MM-2) observadas previamente (110). Por otro lado, las líneas con baja expresión de MALT1 determinada por WB (RPMI-8226, OPM-2, LP-1, KARPAS-620 y L363), presentaban copias extras del gen MALT1 (la mitad de las cuales estaban sobre-expresadas). La línea celular JJN-3, con niveles elevados de expresión de MALT1 según nuestro WB, no presentaba una sobreexpresión de MALT1 por qRT-PCR. En este caso, otros mecanismos de regulación podrían estar por tanto implicados en la expresión de la proteína MALT1.

El perfil de expresión obtenido mediante WB utilizando el anticuerpo RON169 es concordante con estudios genéticos previos. Sánchez-Izquierdo y sus colaboradores observaron que las líneas celulares humanas SSK41 (LDBGB) y RIVA (linfoma de células B), en las que detectamos un nivel elevado de expresión de MALT1 mediante WB (como puede observarse en la Figura 1F del artículo), presentaban respectivamente, 7 y 5 copias extras del ADN de MALT1 en ambos casos con la amplificación genómica de la banda 18q21 (109). En esa publicación, la línea celular MD901 (linfoma de células B) tenía 3 copias del gen MALT1 en la zona 18q21, consistente con la expresión media que observamos en nuestro estudio. Finalmente, la línea celular KARPAS 422, con pequeñas cantidades de la proteína MALT1, presentó solo dos copias de ADN de MALT1. Estos resultados confirman que la expresión de la proteína MALT1, detectada mediante WB utilizando el anticuerpo monoclonal RON169, se correlaciona con la amplificación del gen MALT1 en diversas líneas celulares derivadas de células B malignas (109, 110).

Los 6 anticuerpos anti-MALT1 generados se probaron en una matriz de tejidos linfoides (bazo, timo, medula ósea y amígdalas) fijados en formol y embebidos en parafina usando diferentes tampones de desenmascaramiento y métodos de revelado, sin embargo, ninguno de ellos funcionó de manera reproducible en la técnica de IHQ.

El análisis de la expresión puede ayudar a esclarecer la implicación de MALT1 en diferentes neoplasias hematológicas y también en las diferentes vías de señalización a las que afecta su desregulación. Por tanto, el anticuerpo RON169, tiene múltiples aplicaciones potenciales en investigación básica en el estudio de las neoplasias linfoides, especialmente en linfomas MALT1 y mielomas.

Con los dos trabajos iniciales presentados en esta Tesis Doctoral queda de manifiesto la utilidad de la inmunización genética como método alternativo, efectivo y viable para la producción de anticuerpos monoclonales de calidad. Esta metodología ha permitido producir nuevos anticuerpos específicos frente a las proteínas BCL6 y MALT1 con utilidad como herramientas para el estudio de las neoplasias linfoides humanas (77, 115). El desarrollo de métodos alternativos de inmunización para la producción de anticuerpos monoclonales, como la inmunización genética, permiten proporcionar una alternativa fiable para solucionar el importante incremento de la demanda de anticuerpos monoclonales para su uso en el diagnóstico rutinario, para el desarrollo de nuevas terapias y para la investigación básica.

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE PRDM1/BLIMP1 EN MÚLTIPLES LINFOMAS DERIVADOS DE CÉLULAS B Y T/NK

La proteína PRDM1 es la principal responsable de la regulación terminal de la diferenciación de los linfocitos B (116) y está asimismo implicada en la regulación de la activación y la homeostasis en los linfocitos T (117). En la presente Tesis Doctoral se presenta la producción y validación de un nuevo anticuerpo monoclonal anti-PRDM1 que reconoce esta proteína de forma específica. Este nuevo anticuerpo permite investigar la expresión de PRDM1 en una gran variedad de tejidos linfoides reactivos y neoplasias linfoides.

Para la producción de este anticuerpo monoclonal se utilizó como inmunógeno la proteína completa recombinante GST-PRDM1, producida en bacterias y purificada por cromatografía de afinidad. Se generaron 25 anticuerpos monoclonales que se caracterizaron y validaron por IHQ en secciones de amígdala congelada y por WB. Entre los 25 anticuerpos generados, se seleccionó el anticuerpo monoclonal proveniente del clon ROS (isotipo IgG1/κ) por su calidad en la detección de la proteína PRDM1 por técnicas de IHQ en secciones de tejido fijado en formol e incluido en parafina. Esta característica es de gran importancia en el diagnóstico de neoplasias linfoides.

La especificidad del anticuerpo monoclonal ROS se demostró en extractos proteicos de amígdala, timo y en 7 líneas celulares derivadas de MM; por WB se detectó una banda específica de 97 kDa. La proteína PRDM1 también se detectó en estos tejidos y preparaciones de líneas celulares mediante IHQ. Tal y como se observa en la Figura 1A del artículo, en 5 de las 7 líneas celulares de MM que se estudiaron (SK-MM-2, KARPAS-620, NCI-H929, OPM-2 y LP-1) se detectó por WB una segunda banda de 80kDa correspondiente a la isoforma PRDM1β.

Como se ilustra en la Figura 1B del artículo, la especificidad del clon ROS frente a PRDM1 también se confirmó utilizando inmunoprecipitados provenientes de lisados de amígdala obtenidos con el anticuerpo polyclonal específico de PRDM1 (cedido por el Dr. Mark M. Davis) o el anticuerpo monoclonal ROS. Estos anticuerpos inmunoprecipitan una proteína con un peso molecular de 97 kDa por WB, que corresponde a la proteína PRDM1. Por el contrario, PRDM1 no se detectó ni por WB ni por IHQ en la línea celular derivada del linfoma de Burkitt, RAJI, que se utilizó como control negativo.

El nuevo anticuerpo monoclonal, clon ROS, permite por tanto la detección específica de PRDM1 por WB, inmunoprecipitación y por IHQ en tejido congelado y en tejido fijado en formol e incluido en parafina. Estas aplicaciones permiten caracterizar la expresión de PRDM1 en tejido linfoide humano en condiciones normales y tumorales.

Como puede observarse en la Figura 2 del artículo, en tejido linfoide reactivo se detectó expresión de PRDM1 de forma intensa en el núcleo de células plasmáticas de los centros germinales y de las áreas interfoliculares, en una población de células B del CG y en algunas células T CD3-positivas aisladas (aproximadamente el 1% del componente reactivo T de la amígdala).

En las células B normales de los centros germinales reactivos, PRDM1 y MUM1/IRF4 se expresaron simultáneamente en ausencia de BCL6. Este patrón de expresión de PRDM1 es requerido para la diferenciación de las células plasmáticas (116). La expresión de la proteína PRDM1 en el núcleo las células plasmáticas de las amígdalas, así como de otros órganos como el bazo, la MO y la lámina propia intestinal, se confirmó utilizando otros marcadores específicos de célula plasmática como CD138/sindecano, p63/VS38c o CD38. El anticuerpo anti-PRDM1 representa, por tanto, una valiosa herramienta para la identificación y estudio de las células plasmáticas reactivas y para investigar la diferenciación terminal de los linfocitos B en condiciones normales.

PRDM1 no se detectó en otros tejidos no linfoides, con la excepción del epitelio escamoso y en el tejido testicular, en las células de Sertoli y en las células germinales indiferenciadas (espermatoцитas) de la zona basal de los túbulos seminíferos. Diferentes estudios publicados posteriormente han confirmado su expresión en estas células no hematológicas donde PRDM1 juega un papel crítico durante la diferenciación celular (118-120).

Con el objetivo de investigar la posible aplicación de este nuevo anticuerpo ROS como marcador diagnóstico, se estudió la expresión de PRDM1 en una serie amplia de neoplasias linfoides humanas B y T mediante IHQ en parafina. Tras analizar un total de 679 casos de linfomas B y T, se observó que PRDM1 se expresa en la totalidad de las neoplasias derivadas de célula plasmática y en los linfomas de célula B con diferenciación plasmacítica: mielomas (n=11), plasmocitomas (n=5), linfomas linfoplasmacíticos (n=3) y LDCBG plasmablásticos (n=15). En todos estos linfomas, PRDM1 se presentaba con un fenotipo CD138-positivo y BCL6-negativo característico.

PRDM1 se expresó de forma variable en cerca de la mitad de los LDCBG convencionales (43%, n=235) y en los linfomas de Hodgkin (41%, n=22). También se detectó en una porción de LLC-B/SLL (15%, n=54) y linfomas foliculares (5%, n=115). No se observó expresión de PRDM1 en los casos evaluados de linfoma linfoblástico B (n=3), linfomas del manto (n=52), linfomas de Burkitt (n=21) y linfomas de la zona marginal (n=14).

La expresión de PRDM1 en el 43% de los LDCBG confirma la heterogeneidad de esta categoría de linfoma. Tal y como describen Hans y sus colaboradores, en LDCBG se pueden identificar dos subgrupos según la expresión de los marcadores (18, 121): BCL6, CD10 y MUM1/IRF4. Estos subgrupos se denominan *LDCBG de tipo CG* y *LDCBG de tipo no-CG* y tienen una entidad clínica e histopatológica propia; determinan el estadiaje, el pronóstico de la enfermedad y el tratamiento de elección (121). Con esto en mente, se investigó la posible correlación entre la expresión de PRDM1 y estos marcadores inmunohistoquímicos. En nuestro estudio, la expresión de PRDM1 no se correlacionó de manera significativa con estos subtipos de LDCBG. Aunque la mayoría de los casos de LDCBG expresaban MUM1/IRF4 junto a PRDM1 (68%), se detectaron casos PRDM1-negativos que expresaban MUM1/IRF4 (48%) y una amplia mayoría de los casos de LDCBG PRDM1y BCL6 positivos (84%).

Por lo tanto, y a diferencia de las células B normales, los resultados obtenidos en nuestro estudio en LDCBG indican que, la distribución y la expresión de las proteínas PRDM1, MUM1/IRF4 y BCL6 están alteradas. Se pone de manifiesto la complejidad de la regulación de la expresión de estos marcadores en neoplasias linfoides B.

En el estudio presentado en esta Tesis Doctoral también se investigó la correlación de la expresión de PRDM1 y la supervivencia de 146 pacientes con LDCBG. En un análisis univariante, la expresión de PRDM1 se correlacionó significativamente ($p<0,05$) con una supervivencia libre de fallo más corta. Los pacientes que expresaron PRDM1 mostraron igualmente una tendencia hacia una menor media de supervivencia y de supervivencia libre de enfermedad, aunque esta diferencia no llegó a ser significativa.

Estudios más recientes en LDCBG han descrito la presencia de alteraciones en las funciones de PRDM1 y su implicación en el desarrollo de este tipo de linfomas; dan una explicación a la expresión detectada de PRDM1 en determinados casos. En estos estudios se ha demostrado que PRDM1 se inactiva por un mecanismo clásico de inactivación de genes

supresores de tumores, específicamente en los *LDCBG de tipo no-CG*. Este hecho sugiere que la inhibición de la diferenciación terminal de los linfocitos B tiene un papel central en la patogénesis de estos linfomas (66, 122). Por otro lado se ha descrito como la represión transcripcional de PRDM1 mediada por BCL6 provoca un bloqueo de la diferenciación terminal en los *LDCBG de tipo CG* (123). Se ha demostrado además como, la presencia de la proteína PRDM1 β (también detectada por el nuevo anticuerpo ROS), podría indicar una lesión más específica de los *LDCBG de tipo no-CG*; su expresión en este tipo de linfomas supone un factor pronóstico desfavorable para supervivencia libre de eventos y supervivencia global (124).

De manera inesperada se detectó una expresión de la proteína PRDM1 en las células H-RS en el 41% de los casos de linfoma de Hodgkin. Este hallazgo, junto con la observación de la expresión de otros marcadores asociados a las células plasmáticas y a la diferenciación terminal de los linfocitos B, podría indicar un origen de las células H-RS asociado a las células B post-CG, células en una fase avanzada del proceso de diferenciación terminal.

Es necesario destacar, sin embargo, que en la mayoría de las células de H-RS de los casos de linfoma de Hodgkin clásico no se observó expresión de PRDM1 o lo expresaron débilmente (en el 64% de los casos). Las etapas de diferenciación de los *LDCBG de tipo no-CG* y de los linfomas de Hodgkin clásico comparten características similares como el bloqueo de esta diferenciación terminal donde PRDM1 podría jugar un papel central. Publicaciones recientes han estudiado la posible alteración de las funciones de PRDM1 en la patogénesis de los linfomas de Hodgkin clásico demostrando que en estas células H-RS, PRDM1 puede estar regulado de forma negativa por microARNs (miARN) endógenos (miR9 y let-7a) que interaccionarían directamente con el ARNm de PRDM1 (125). Aunque los mecanismos responsables de los altos niveles de microARNs necesitan ser estudiados más detalladamente, se cree que este mecanismo evitaría la diferenciación terminal en una fase pre-plasmablástica previa a la expresión en altos niveles de la proteína PRDM1. Esta interferencia resultaría un ventaja para la supervivencia y el crecimiento continuado de las células de H-RS y puede ser responsable de la patogenicidad en la transformación de células B post-CG a células de H-RS (125).

En el presente estudio se identificó un pequeño subgrupo de LLC-B/SLL PRDM1-positivo (15% de los casos). Se ha descrito que la disminuida capacidad de diferenciación en LLC-B está asociada con la represión de la expresión de PRDM1 (126). Aunque existen raros casos de LLC-B/SLL en los que se describe una sutil diferenciación plasmacítica, en nuestra serie, no pudimos asociar esta expresión débil de la proteína PRDM1 con diferenciación

plasmacítica. La expresión de PRDM1 tampoco se correlacionó con la expresión de CD38, con la presencia del virus de Epstein-Barr, con el índice de mutación o con diferencias en la supervivencia de los pacientes con LLC-B/SLL. Por todo ello, consideramos que se necesitan nuevos estudios que clarifiquen el rol de PRDM1 en esta enfermedad.

Finalmente, aunque la expresión de la proteína PRDM1 se asoció principalmente a la diferenciación terminal de las células B, se detectó expresión de PRDM1 en un pequeño porcentaje de células T no-neoplásicas CD3-positivas (estimado en torno al 1% del componente reactivo de la amígdala). Aunque se ha descrito el posible papel de PRDM1 sobre el control de la homeostasis en la activación y en la diferenciación de los linfocitos T (117, 127, 128), muy poco es conocido acerca de la expresión de PRDM1 en estos linfocitos y en los linfomas T.

Curiosamente, y pese a la escasa expresión de PRDM1 en linfocitos T normales, se observó expresión de PRDM1 en más de la mitad de los linfomas T anaplásicos de células grande (56,7%, n=30) y en menor medida en los linfomas T periféricos NOS (27%, n=41), en linfomas T/NK de tipo nasal (8%, n=12) y en linfomas T angioinmunoblasticos (6%, n=18). Estos resultados son similares a los obtenidos en estudios posteriores donde evalúan además PRDM1 por PCR semicuantitativa en las células de linfomas T obtenidas por microdissección laser (117). En estos estudios destacan el papel de la isoforma PRDM1 β en los linfomas T y, como su expresión podría ser un factor de peor pronóstico, correlacionado con una menor supervivencia y un estadio de la enfermedad más desfavorable (117).

El anticuerpo monoclonal, clon ROS, producido y validado en la presente Tesis Doctoral ha demostrado ser capaz de detectar la proteína PRDM1 por IHQ en parafina. Destaca el papel crítico de PRDM1 en la diferenciación del tejido linfoide reactivo y en el desarrollo de neoplasias linfoides humanas B y T.

A nivel diagnóstico, este marcador es especialmente relevante en linfomas caracterizados por una diferenciación plasmacítica (mielomas, plasmacitomas, linfomas linfoplasmacíticos, linfomas plasmablasticos de tipo de mucosa oral y LDCBG con morfología inmunoblastica). En LDCBG muestra una disociación entre la expresión y la regulación mutua de PRDM1 y MUM1/IRF4 en células neoplásicas. Por último, en *LDCBG de tipo no-CG* y en linfomas T, PRDM1 es además un marcador pronóstico desfavorable. Estos resultados convierten al anticuerpo anti-PRDM1, clon ROS en una herramienta de gran valor para la investigación básica y aplicada al diagnóstico de las neoplasias linfoides humanas.

ANTICUERPOS MONOCLONALES PARA LA DETECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS MALT1, BCL6 y PRDM1/BLIMP1

Los nuevos anticuerpos monoclonales específicos frente a las proteínas MALT1, BCL6 y PRDM1/BLIMP1 que se han producido, validado y caracterizado en la presente Tesis Doctoral representan herramientas de gran interés como marcadores de las neoplasias linfoides humanas con fines investigacionales y aplicados para el diagnóstico de estas neoplasias.

Fruto de este interés, en la actualidad los tres anticuerpos monoclonales han sido licenciados en algunas de las más prestigiosas compañías internacionales que comercializan anticuerpos tal y como se resume en el Anexo 1.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La inmunización genética vía *Gene Gun* es un método alternativo, efectivo y viable para la generación de anticuerpos monoclonales de alta calidad.
2. El anticuerpo monoclonal GI191E/A8 frente a la proteína BCL6 es una herramienta de gran valor en el diagnóstico de las neoplasias linfoides humanas debido a su capacidad de detectar la expresión de la proteína con mayor sensibilidad y de manera más independiente de la fijación que los clones ST42B/H7 y PG-B6p generados por inmunización convencional.
3. El anticuerpo monoclonal RON169 frente a la proteína MALT1 permite detectar de forma específica la proteína por WB e inmunoprecipitación, por lo que tiene múltiples aplicaciones en la investigación de neoplasias linfoides.
4. Mediante la utilización del anticuerpo ROS frente a la proteína PRMD1, se ha descrito y documentado por primera vez la expresión de dicha proteína a nivel celular en tejido normal y en neoplasias linfoides humanas; esto demuestra su utilidad como marcador de la diferenciación terminal de los linfocitos B y de las células plasmáticas.
5. PRDM1 se expresa en la mayoría de los linfomas caracterizados por una diferenciación plasmacítica (mielomas, plasmacitomas, linfomas linfoplasmacíticos, linfomas plasmablasticos de tipo de mucosa oral y LDCBG con morfología inmunoblastica). También se detectó su expresión en el 43% de los LDCBG, 41% de los linfomas de Hodgkin, 23% de los linfomas T y en un subgrupo de LLC-B/SLL (15%).
6. La expresión de la proteína PRDM1 se correlaciona con una menor supervivencia libre de fallo en LDCBG, por lo que tiene además un interés como marcador pronóstico.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Perez EA, Cortes J, Gonzalez-Angulo AM, Bartlett JM. HER2 testing: current status and future directions. *Cancer treatment reviews*. 2014;40(2):276-84.
2. Jackisch C, Lammers P, Jacobs I. Evolving landscape of human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer treatment and the future of biosimilars. *Breast*. 2017;32:199-216.
3. Fisher SG, Fisher RI. The epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma. *Oncogene*. 2004;23(38):6524-34.
4. Lukes RJ, Collins RD. Lukes-Collins classification and its significance. *Cancer Treat Rep*. 1977;61(6):971-9.
5. Jaffe ES, Harris, N. L., Stein, H. & Vardiman, J. W. World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues (eds Kleihuis, P. & Sobin, L.) (IARC, Lyon). 2001.
6. Jaffe ES, Harris NL, Diebold J, Muller-Hermelink HK. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. A progress report. *Am J Clin Pathol*. 1999;111(1 Suppl 1):S8-12.
7. Lennert K. Letter: Origin of malignant lymphomas. *Lancet*. 1974;2(7880):586.
8. Lennert K. [Non-Hodgkin's lymphomas: principles and application of the Kiel classification]. *Verh Dtsch Ges Pathol*. 1992;76:1-13.
9. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*. 1994;84(5):1361-92.
10. Rappaport H. Comparative aspects of hematopoietic neoplasms of man and animals--summary. *Natl Cancer Inst Monogr*. 1969;32:359-61.
11. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016;127(20):2375-90.
12. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. , editors. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. In: Bosman FT, Jaffe ES, Lakhani SR, Ohgaki H, eds. World Health Organization Classification of Tumours. Lyon, France: IARC; 2008.
13. Cancer. IAfRo. *World Cancer Report 2014*. . 2014.
14. GENESER, Finn – “Histología sobre bases biomoleculares” Edit .Médica Panamericana 3ra. ed. 2000.
15. Blum KS, Pabst R. Keystones in lymph node development. *Journal of anatomy*. 2006;209(5):585-95.
16. Kuppers R, Klein U, Hansmann ML, Rajewsky K. Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med*. 1999;341(20):1520-9.
17. Kuppers R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(4):251-62.
18. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000;403(6769):503-11.

19. Staudt LM, Dave S. The biology of human lymphoid malignancies revealed by gene expression profiling. *Adv Immunol.* 2005;87:163-208.
20. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, Mattioli M, Cattoretti G, Husson H, et al. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med.* 2001;194(11):1625-38.
21. Falini B, Mason DY. Proteins encoded by genes involved in chromosomal alterations in lymphoma and leukemia: clinical value of their detection by immunocytochemistry. *Blood.* 2002;99(2):409-26.
22. Kuppers R, Dalla-Favera R. Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene.* 2001;20(40):5580-94.
23. Willis TG, Dyer MJ. The role of immunoglobulin translocations in the pathogenesis of B-cell malignancies. *Blood.* 2000;96(3):808-22.
24. Bajalica-Lagercrantz S, Piehl F, Lagercrantz J, Lindahl J, Weber G, Kerckebart JP, et al. Expression of LAZ3/BCL6 in follicular center (FC) B cells of reactive lymph nodes and FC-derived non-Hodgkin lymphomas. *Leukemia.* 1997;11(4):594-8.
25. Fukuda T, Miki T, Yoshida T, Hatano M, Ohashi K, Hirosewa S, et al. The murine BCL6 gene is induced in activated lymphocytes as an immediate early gene. *Oncogene.* 1995;11(8):1657-63.
26. Yoshida S, Kaneita Y, Aoki Y, Seto M, Mori S, Moriyama M. Identification of heterologous translocation partner genes fused to the BCL6 gene in diffuse large B-cell lymphomas: 5'-RACE and LA - PCR analyses of biopsy samples. *Oncogene.* 1999;18(56):7994-9.
27. Pasqualucci L, Migliazza A, Fracchiolla N, William C, Neri A, Baldini L, et al. BCL-6 mutations in normal germinal center B cells: evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(20):11816-21.
28. Migliazza A, Martinotti S, Chen W, Fusco C, Ye BH, Knowles DM, et al. Frequent somatic hypermutation of the 5' noncoding region of the BCL6 gene in B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(26):12520-4.
29. Poulsen CB, Borup R, Nielsen FC, Borregaard N, Hansen M, Gronbaek K, et al. Microarray-based classification of diffuse large B-cell lymphoma. *Eur J Haematol.* 2005;74(6):453-65.
30. Sanchez-Beato M, Sanchez-Aguilera A, Piris MA. Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas. *Blood.* 2003;101(4):1220-35.
31. Thome M. CARMA1, BCL-10 and MALT1 in lymphocyte development and activation. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(5):348-59.
32. Chan JK. The new World Health Organization classification of lymphomas: the past, the present and the future. *Hematol Oncol.* 2001;19(4):129-50.
33. O'Malley DP, Auerbach A, Weiss LM. Practical Applications in Immunohistochemistry: Evaluation of Diffuse Large B-Cell Lymphoma and Related Large B-Cell Lymphomas. *Arch Pathol Lab Med.* 2015;139(9):1094-107.
34. Henrickson SE, Hartmann EM, Ott G, Rosenwald A. Gene expression profiling in malignant lymphomas. *Adv Exp Med Biol.* 2007;593:134-46.
35. Baron BW, Nucifora G, McCabe N, Espinosa R, 3rd, Le Beau MM, McKeithan TW. Identification of the gene associated with the recurring chromosomal translocations t(3;14)(q27;q32) and t(3;22)(q27;q11) in B-cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(11):5262-6.

36. Ye BH, Cattoretti G, Shen Q, Zhang J, Hawe N, de Waard R, et al. The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2-type inflammation. *Nat Genet.* 1997;16(2):161-70.
37. Shaffer AL, Yu X, He Y, Boldrick J, Chan EP, Staudt LM. BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control. *Immunity.* 2000;13(2):199-212.
38. Artiga MJ, Saez AI, Romero C, Sanchez-Beato M, Mateo MS, Navas C, et al. A short mutational hot spot in the first intron of BCL-6 is associated with increased BCL-6 expression and with longer overall survival in large B-cell lymphomas. *Am J Pathol.* 2002;160(4):1371-80.
39. Dogan A, Bagdi E, Munson P, Isaacson PG. CD10 and BCL-6 expression in paraffin sections of normal lymphoid tissue and B-cell lymphomas. *Am J Surg Pathol.* 2000;24(6):846-52.
40. Jardin F, Sahota SS. Targeted somatic mutation of the BCL6 proto-oncogene and its impact on lymphomagenesis. *Hematology.* 2005;10(2):115-29.
41. Bastard C, Deweindt C, Kerckaert JP, Lenormand B, Rossi A, Pezzella F, et al. LAZ3 rearrangements in non-Hodgkin's lymphoma: correlation with histology, immunophenotype, karyotype, and clinical outcome in 217 patients. *Blood.* 1994;83(9):2423-7.
42. Lo Coco F, Ye BH, Lista F, Corradini P, Offit K, Knowles DM, et al. Rearrangements of the BCL6 gene in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma. *Blood.* 1994;83(7):1757-9.
43. Otsuki T, Yano T, Clark HM, Bastard C, Kerckaert JP, Jaffe ES, et al. Analysis of LAZ3 (BCL-6) status in B-cell non-Hodgkin's lymphomas: results of rearrangement and gene expression studies and a mutational analysis of coding region sequences. *Blood.* 1995;85(10):2877-84.
44. Ueda C, Uchiyama T, Ohno H. Immunoglobulin (Ig)/BCL6 versus non-Ig/BCL6 gene fusion in diffuse large B-cell lymphoma corresponds to a high- versus low-level expression of BCL6 mRNA. *Blood.* 2002;99(7):2624-5.
45. Peng HZ, Du MQ, Koulis A, Aiello A, Dogan A, Pan LX, et al. Nonimmunoglobulin gene hypermutation in germinal center B cells. *Blood.* 1999;93(7):2167-72.
46. Shen HM, Peters A, Baron B, Zhu X, Storb U. Mutation of BCL-6 gene in normal B cells by the process of somatic hypermutation of Ig genes. *Science.* 1998;280(5370):1750-2.
47. Gaidano G, Carbone A, Pastore C, Capello D, Migliazza A, Gloghini A, et al. Frequent mutation of the 5' noncoding region of the BCL-6 gene in acquired immunodeficiency syndrome-related non-Hodgkin's lymphomas. *Blood.* 1997;89(10):3755-62.
48. Kawamata N, Miki T, Fukuda T, Hiroshima S, Aoki N. The organization of the BCL6 gene. *Leukemia.* 1994;8(8):1327-30.
49. Lossos IS, Jones CD, Warnke R, Natkunam Y, Kaizer H, Zehnder JL, et al. Expression of a single gene, BCL-6, strongly predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 2001;98(4):945-51.
50. Demeyer A, Staal J, Beyaert R. Targeting MALT1 Proteolytic Activity in Immunity, Inflammation and Disease: Good or Bad? *Trends Mol Med.* 2016;22(2):135-50.
51. Afonina IS, Elton L, Carpentier I, Beyaert R. MALT1—a universal soldier: multiple strategies to ensure NF- κ B activation and target gene expression. *FEBS J.* 2015;282(17):3286-97.
52. Jaworski M, Thome M. The paracaspase MALT1: biological function and potential for therapeutic inhibition. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(3):459-73.
53. McAllister-Lucas LM, Baens M, Lucas PC. MALT1 protease: a new therapeutic target in B lymphoma and beyond? *Clin Cancer Res.* 2011;17(21):6623-31.

54. Boi M, Zucca E, Inghirami G, Bertoni F. PRDM1/BLIMP1: a tumor suppressor gene in B and T cell lymphomas. *Leuk Lymphoma*. 2015;56(5):1223-8.
55. Turner CA, Jr., Mack DH, Davis MM. Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells. *Cell*. 1994;77(2):297-306.
56. Messika EJ, Lu PS, Sung YJ, Yao T, Chi JT, Chien YH, et al. Differential effect of B lymphocyte-induced maturation protein (Blimp-1) expression on cell fate during B cell development. *J Exp Med*. 1998;188(3):515-25.
57. Crotty S, Johnston RJ, Schoenberger SP. Effectors and memories: Bcl-6 and Blimp-1 in T and B lymphocyte differentiation. *Nature immunology*. 2010;11(2):114-20.
58. Gyory I, Fejer G, Ghosh N, Seto E, Wright KL. Identification of a functionally impaired positive regulatory domain I binding factor 1 transcription repressor in myeloma cell lines. *J Immunol*. 2003;170(6):3125-33.
59. Piskurich JF, Lin KI, Lin Y, Wang Y, Ting JP, Calame K. BLIMP-I mediates extinction of major histocompatibility class II transactivator expression in plasma cells. *Nature immunology*. 2000;1(6):526-32.
60. Lin Y, Wong K, Calame K. Repression of c-myc transcription by Blimp-1, an inducer of terminal B cell differentiation. *Science*. 1997;276(5312):596-9.
61. Ghosh N, Gyory I, Wright G, Wood J, Wright KL. Positive regulatory domain I binding factor 1 silences class II transactivator expression in multiple myeloma cells. *J Biol Chem*. 2001;276(18):15264-8.
62. Lin KI, Angelin-Duclos C, Kuo TC, Calame K. Blimp-1-dependent repression of Pax-5 is required for differentiation of B cells to immunoglobulin M-secreting plasma cells. *Mol Cell Biol*. 2002;22(13):4771-80.
63. Shaffer AL, Lin KI, Kuo TC, Yu X, Hurt EM, Rosenwald A, et al. Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity*. 2002;17(1):51-62.
64. Shaffer AL, Wright G, Yang L, Powell J, Ngo V, Lamy L, et al. A library of gene expression signatures to illuminate normal and pathological lymphoid biology. *Immunol Rev*. 2006;210:67-85.
65. Calame KL, Lin KI, Tunyaplin C. Regulatory mechanisms that determine the development and function of plasma cells. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:205-30.
66. Tam W, Gomez M, Chadburn A, Lee JW, Chan WC, Knowles DM. Mutational analysis of PRDM1 indicates a tumor-suppressor role in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood*. 2006;107(10):4090-100.
67. Angelin-Duclos C, Cattoretti G, Lin KI, Calame K. Commitment of B lymphocytes to a plasma cell fate is associated with Blimp-1 expression in vivo. *J Immunol*. 2000;165(10):5462-71.
68. Cattoretti G, Angelin-Duclos C, Shaknovich R, Zhou H, Wang D, Alobeid B. PRDM1/Blimp-1 is expressed in human B-lymphocytes committed to the plasma cell lineage. *J Pathol*. 2005;206(1):76-86.
69. Vrzalikova K, Leonard S, Fan Y, Bell A, Vockerodt M, Flodr P, et al. Hypomethylation and Over-Expression of the Beta Isoform of BLIMP1 is Induced by Epstein-Barr Virus Infection of B Cells; Potential Implications for the Pathogenesis of EBV-Associated Lymphomas. *Pathogens*. 2012;1(2):83-101.
70. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975;256(5517):495-7.

71. Cossman J, Chused TM, Fisher RI, Magrath I, Bollum F, Jaffe ES. Diversity of immunological phenotypes of lymphoblastic lymphoma. *Cancer Res.* 1983;43(9):4486-90.
72. Ishii Y, Takami T, Yuasa H, Takei T, Kikuchi K. Two distinct antigen systems in human B lymphocytes: identification of cell surface and intracellular antigens using monoclonal antibodies. *Clin Exp Immunol.* 1984;58(1):183-92.
73. Mason DY, Comans-Bitter WM, Cordell JL, Verhoeven MA, van Dongen JJ. Antibody L26 recognizes an intracellular epitope on the B-cell-associated CD20 antigen. *Am J Pathol.* 1990;136(6):1215-22.
74. Mason DY, Cordell J, Brown M, Pallesen G, Ralfkiaer E, Rothbard J, et al. Detection of T cells in paraffin wax embedded tissue using antibodies against a peptide sequence from the CD3 antigen. *J Clin Pathol.* 1989;42(11):1194-200.
75. Mason DY, Krissansen GW, Davey FR, Crumpton MJ, Gatter KC. Antisera against epitopes resistant to denaturation on T3 (CD3) antigen can detect reactive and neoplastic T cells in paraffin embedded tissue biopsy specimens. *J Clin Pathol.* 1988;41(2):121-7.
76. Zola H, Swart B, Nicholson I, Aasted B, Bensussan A, Boumsell L, et al. CD molecules 2005: human cell differentiation molecules. *Blood.* 2005;106(9):3123-6.
77. Garcia JF, Maestre L, Lucas E, Sanchez-Verde L, Romero-Chala S, Piris MA, et al. Genetic immunization: a new monoclonal antibody for the detection of BCL-6 protein in paraffin sections. *J Histochem Cytochem.* 2006;54(1):31-8.
78. Falini B, Fizzotti M, Pucciarini A, Bigerna B, Marafioti T, Gambacorta M, et al. A monoclonal antibody (MUM1p) detects expression of the MUM1/IRF4 protein in a subset of germinal center B cells, plasma cells, and activated T cells. *Blood.* 2000;95(6):2084-92.
79. Liu S, Wang S, Lu S. DNA immunization as a technology platform for monoclonal antibody induction. *Emerg Microbes Infect.* 2016;5:e33.
80. Gurunathan S, Klinman DM, Seder RA. DNA vaccines: immunology, application, and optimization*. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:927-74.
81. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Inmunología celular y molecular. Sanunders-Elsevier. 2004;5º Ed.
82. Hasson S, Al-Busaidi J, Sallam T. The past, current and future trends in DNA vaccine immunisations. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.* 2015;5(5):10.
83. Abdulhaqq SA, Weiner DB. DNA vaccines: developing new strategies to enhance immune responses. *Immunol Res.* 2008;42(1-3):219-32.
84. Curcio C, Khan AS, Amici A, Spadaro M, Quaglino E, Cavallo F, et al. DNA immunization using constant-current electroporation affords long-term protection from autochthonous mammary carcinomas in cancer-prone transgenic mice. *Cancer Gene Ther.* 2008;15(2):108-14.
85. Wang S, Zhang C, Zhang L, Li J, Huang Z, Lu S. The relative immunogenicity of DNA vaccines delivered by the intramuscular needle injection, electroporation and gene gun methods. *Vaccine.* 2008;26(17):2100-10.
86. Moreno S, Timón M. DNA vaccination: an immunological perspective
Inmunología
2004;23(1):15.
87. Elnekave M, Furmanov K, Hovav AH. Intradermal naked plasmid DNA immunization: mechanisms of action. *Expert review of vaccines.* 2011;10(8):1169-82.

88. Costagliola S, Rodien P, Many MC, Ludgate M, Vassart G. Genetic immunization against the human thyrotropin receptor causes thyroiditis and allows production of monoclonal antibodies recognizing the native receptor. *J Immunol.* 1998;160(3):1458-65.
89. Nagata S, Salvatore G, Pastan I. DNA immunization followed by a single boost with cells: a protein-free immunization protocol for production of monoclonal antibodies against the native form of membrane proteins. *J Immunol Methods.* 2003;280(1-2):59-72.
90. Krasemann S, Jurgens T, Bodemer W. Generation of monoclonal antibodies against prion proteins with an unconventional nucleic acid-based immunization strategy. *J Biotechnol.* 1999;73(2-3):119-29.
91. Chambers RS, Johnston SA. High-level generation of polyclonal antibodies by genetic immunization. *Nat Biotechnol.* 2003;21(9):1088-92.
92. Kilpatrick KE, Kerner S, Dixon EP, Hutchins JT, Parham JH, Condreay JP, et al. In vivo expression of a GST-fusion protein mediates the rapid generation of affinity matured monoclonal antibodies using DNA-based immunizations. *Hybrid Hybridomics.* 2002;21(4):237-43.
93. Puttikhunt C, Kasinrerk W, Srisa-ad S, Duangchinda T, Silakate W, Moonsom S, et al. Production of anti-dengue NS1 monoclonal antibodies by DNA immunization. *J Virol Methods.* 2003;109(1):55-61.
94. Pupa SM, Forti S, Invernizzi AM, Giovanazzi R, Twal WO, Argraves WS, et al. Monoclonal antibody to fibulin-1 generated by genetic immunization. *J Cell Biochem.* 2003;89(4):647-52.
95. Barry MA, Barry ME, Johnston SA. Production of monoclonal antibodies by genetic immunization. *Biotechniques.* 1994;16(4):616-8, 20.
96. Leinonen J, Niemela P, Lovgren J, Bocchi L, Pettersson K, Nevanlinna H, et al. Characterization of monoclonal antibodies against prostate specific antigen produced by genetic immunization. *J Immunol Methods.* 2004;289(1-2):157-67.
97. Kallioniemi OP, Wagner U, Kononen J, Sauter G. Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Hum Mol Genet.* 2001;10(7):657-62.
98. Garcia JF, Camacho FI, Morente M, Fraga M, Montalban C, Alvaro T, et al. Hodgkin and Reed-Sternberg cells harbor alterations in the major tumor suppressor pathways and cell-cycle checkpoints: analyses using tissue microarrays. *Blood.* 2003;101(2):681-9.
99. Saez AI, Saez AJ, Artiga MJ, Perez-Rosado A, Camacho FI, Diez A, et al. Building an outcome predictor model for diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Pathol.* 2004;164(2):613-22.
100. Gregory CD, Rowe M, Rickinson AB. Different Epstein-Barr virus-B cell interactions in phenotypically distinct clones of a Burkitt's lymphoma cell line. *J Gen Virol.* 1990;71 (Pt 7):1481-95.
101. Takada K, Horinouchi K, Ono Y, Aya T, Osato T, Takahashi M, et al. An Epstein-Barr virus-producer line Akata: establishment of the cell line and analysis of viral DNA. *Virus Genes.* 1991;5(2):147-56.
102. Mason DY CJ, Pulford KAF. Production of monoclonal antibodies for immunocytochemical use, in Bullock GR, Pe-trusz P (eds). *Techniques in Immunocytochemistry.* London,UK, Academic Press. 1983;012:175.
103. Sanchez-Aguilera A, Delgado J, Camacho FI, Sanchez-Beato M, Sanchez L, Montalban C, et al. Silencing of the p18INK4c gene by promoter hypermethylation in Reed-Sternberg cells in Hodgkin lymphomas. *Blood.* 2004;103(6):2351-7.

104. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.
105. Marafioti T, Jones M, Facchetti F, Diss TC, Du MQ, Isaacson PG, et al. Phenotype and genotype of interfollicular large B cells, a subpopulation of lymphocytes often with dendritic morphology. *Blood*. 2003;102(8):2868-76.
106. Mason DY, Micklem K, Jones M. Double immunofluorescence labelling of routinely processed paraffin sections. *J Pathol*. 2000;191(4):452-61.
107. Gellrich S, Ventura R, Jones M, Tan SY, Mason DY. Immunofluorescent and FISH analysis of skin biopsies. *Am J Dermatopathol*. 2004;26(3):242-7.
108. Rodriguez A, Martinez N, Camacho FI, Ruiz-Ballesteros E, Algara P, Garcia JF, et al. Variability in the degree of expression of phosphorylated IkappaBalphα in chronic lymphocytic leukemia cases with nodal involvement. *Clin Cancer Res*. 2004;10(20):6796-806.
109. Sanchez-Izquierdo D, Buchonnet G, Siebert R, Gascoyne RD, Climent J, Karran L, et al. MALT1 is deregulated by both chromosomal translocation and amplification in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2003;101(11):4539-46.
110. Largo C, Alvarez S, Saez B, Blesa D, Martin-Subero JI, Gonzalez-Garcia I, et al. Identification of overexpressed genes in frequently gained/amplified chromosome regions in multiple myeloma. *Haematologica*. 2006;91(2):184-91.
111. Isaacson PG, Du MQ. MALT lymphoma: from morphology to molecules. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(8):644-53.
112. Bertoni F, Zucca E. Delving deeper into MALT lymphoma biology. *J Clin Invest*. 2006;116(1):22-6.
113. Rosebeck S, Rehman AO, Lucas PC, McAllister-Lucas LM. From MALT lymphoma to the CBM signalosome: three decades of discovery. *Cell cycle*. 2011;10(15):2485-96.
114. Xu Y, Hu J, Wang X, Xuan L, Lai J, Xu L, et al. Overexpression of MALT1-A20-NF-kappaB in adult B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell Int*. 2015;15:73.
115. Maestre L, Fontan L, Martinez-Climent JA, Garcia JF, Cigudosa JC, Roncador G. Generation of a new monoclonal antibody against MALT1 by genetic immunization. *Hybridoma (Larchmt)*. 2007;26(2):86-91.
116. Shapiro-Shelef M, Calame K. Regulation of plasma-cell development. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(3):230-42.
117. Zhao WL, Liu YY, Zhang QL, Wang L, Leboeuf C, Zhang YW, et al. PRDM1 is involved in chemoresistance of T-cell lymphoma and down-regulated by the proteasome inhibitor. *Blood*. 2008;111(7):3867-71.
118. Kallies A, Nutt SL. Terminal differentiation of lymphocytes depends on Blimp-1. *Curr Opin Immunol*. 2007;19(2):156-62.
119. Magnusdottir E, Kalachikov S, Mizukoshi K, Savitsky D, Ishida-Yamamoto A, Panteleyev AA, et al. Epidermal terminal differentiation depends on B lymphocyte-induced maturation protein-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(38):14988-93.
120. Hayashi K, de Sousa Lopes SM, Surani MA. Germ cell specification in mice. *Science*. 2007;316(5823):394-6.

121. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*. 2004;103(1):275-82.
122. Pasqualucci L, Compagno M, Houldsworth J, Monti S, Grunn A, Nandula SV, et al. Inactivation of the PRDM1/BLIMP1 gene in diffuse large B cell lymphoma. *J Exp Med*. 2006;203(2):311-7.
123. Parekh S, Polo JM, Shaknovich R, Juszczynski P, Lev P, Ranuncolo SM, et al. BCL6 programs lymphoma cells for survival and differentiation through distinct biochemical mechanisms. *Blood*. 2007;110(6):2067-74.
124. Liu YY, Leboeuf C, Shi JY, Li JM, Wang L, Shen Y, et al. Rituximab plus CHOP (R-CHOP) overcomes PRDM1-associated resistance to chemotherapy in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2007;110(1):339-44.
125. Nie K, Gomez M, Landgraf P, Garcia JF, Liu Y, Tan LH, et al. MicroRNA-mediated down-regulation of PRDM1/Blimp-1 in Hodgkin/Reed-Sternberg cells: a potential pathogenetic lesion in Hodgkin lymphomas. *Am J Pathol*. 2008;173(1):242-52.
126. Duckworth A, Glenn M, Slupsky JR, Packham G, Kalakonda N. Variable induction of PRDM1 and differentiation in chronic lymphocytic leukemia is associated with anergy. *Blood*. 2014;123(21):3277-85.
127. Martins GA, Cimmino L, Shapiro-Shelef M, Szabolcs M, Herron A, Magnusdottir E, et al. Transcriptional repressor Blimp-1 regulates T cell homeostasis and function. *Nature immunology*. 2006;7(5):457-65.
128. Kallies A, Hawkins ED, Belz GT, Metcalf D, Hommel M, Corcoran LM, et al. Transcriptional repressor Blimp-1 is essential for T cell homeostasis and self-tolerance. *Nature immunology*. 2006;7(5):466-74.

ANEXOS

ANEXO 1. COMERCIALIZACIÓN DE LOS ANTICUERPOS

Los nuevos anticuerpos monoclonales específicos frente a las proteínas MALT1, BCL6 y PRDM1/BLIMP1 que se han producido, validado y caracterizado en la presente Tesis Doctoral han sido licenciados en diferentes compañías internacionales.

El anticuerpo monoclonal **anti-BCL6** se ha licenciado en las siguientes compañías:

- Ventana (www.ventana.com). Número de Catálogo: 760-4241
- BioLegend (www.biologend.com). Número de Catálogo: 648301 y 648302
- ThermoFisher (www.thermofisher.com). Número de Catálogo: 14-9887-82 y 14-9887-80.
Previamente comercializado por eBioscience e Invitrogen.
- Biocare Medical (biocare.net). Número de Catálogo: 907-023
- Active Motif (www.activemotif.com). Número de Catálogo: 61193, 61194

El anticuerpo monoclonal **anti-MALT1** se ha licenciado en la compañía:

- Sigma – Aldrich (www.sigmaldrich.com). Número de Catálogo: SAB4200126

Finalmente, el anticuerpo monoclonal **anti-PRDM1/BLIMP1** se ha licenciado en las siguientes compañías:

- BioLegend (www.biologend.com). Número de Catálogo: 648202
- Active Motive (www.activemotif.com). Número de Caálogo: 61168 y 61167

Esta comercialización ha generado y sigue generando un retorno económico importante para el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO). Adicionalmente, el CNIO ofrece a grupos de investigación externos estos anticuerpos monoclonales (www.cnio.es/es/servicios/anticuerpos).

A continuación, se presentan los detalles de la caracterización de los tres anticuerpos y las especificaciones técnicas de estos anticuerpos monoclonales por las compañías comercializadoras.

Anticuerpo anti- BCL6

BCL6 validation file (Lot 152)

Target: BCL6

Protein predicted molecular weight: 95kDa

Clone name: GI191E

Description: mouse monoclonal

Antigen used: pCDNA3-BCL6 plasmid vector (full length sequence of human BCL6)

Isotype: IgG1

Antigen Species: human, mouse and rat

Localization: nuclear

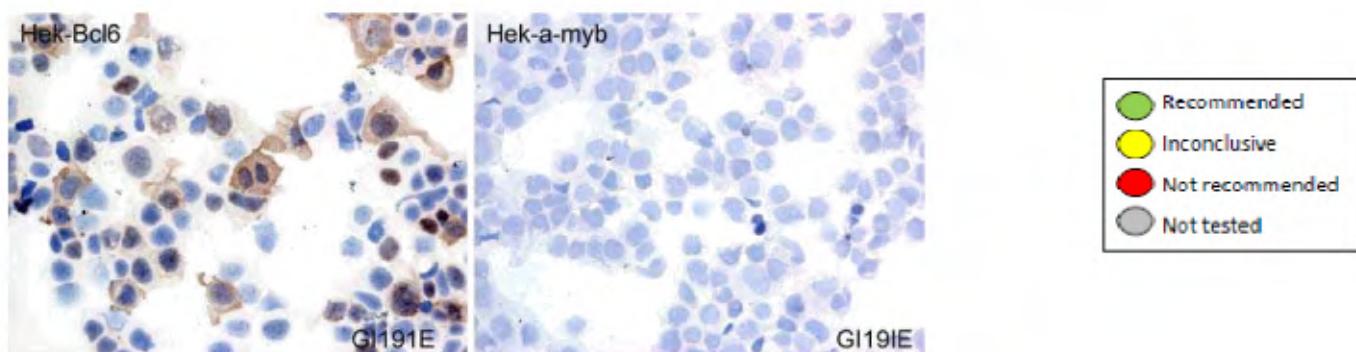
Positive control: Tonsil

Storage Buffer: Preservative: Sodium Azide. Constituents: Tissue culture supernatant

Storage: Aliquot and store at 4C. Do not freeze

Characterization

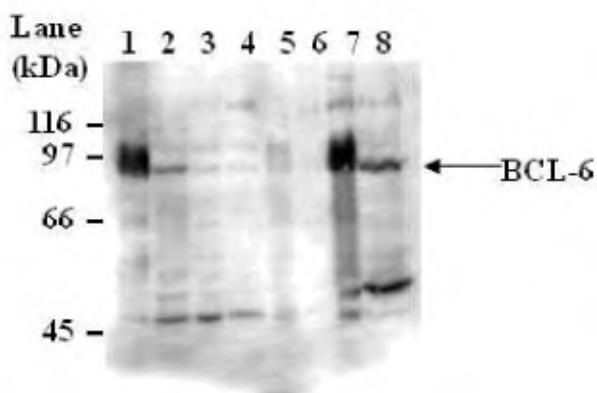
To confirm that GI191E mAb recognized human BCL6 protein, immunohistochemistry on frozen cytocentrifuge preparations of human BCL6 expressed in Hek293T was performed. Cytospin preparation of human a-myb protein was used as a negative control.



Applications

- WB- Western Blotting: GI191E mAb is able to detect human, rat and mouse BCL6 protein by WB.

Dilution: GI191E mAb was used as 1:20 dilution.



Predicted molecular weight: **95kDa**
Observed molecular weight: **95kDa**

Lanes

Lane 1 Raji cell line	(50ug) (+)
Lane 2 U937 cell line	(50ug) (+)
Lane 3 HL-60 cell line	(50ug) (+)
Lane 4 k562 cell line	(42ug) (+)
Lane 5 HeLa cell line	(50ug) (+)
Lane 6 Ba/F3 mouse cell line	(10ug) (-)
Lane 7 WR19L mouse cell line	(50ug) (+)
Lane 8 PC12 rat cell line	(50ug) (+)

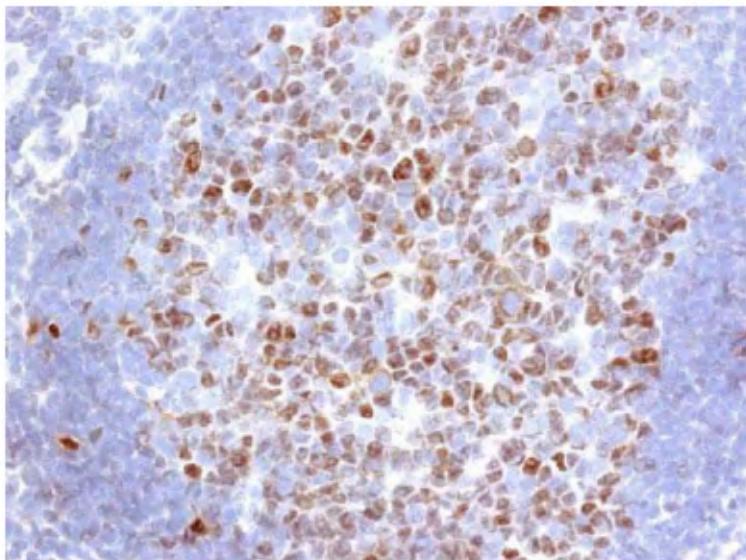
BCL6 validation file (Lot 152)

- **IHC-F-Immunohistochemistry (frozen):** Antibody GI191E can be used to detect BCL6 protein in frozen tissue.

Tissue sample: Human Tonsil

Dilution: 1:100

Antibody incubation: 30 minutes



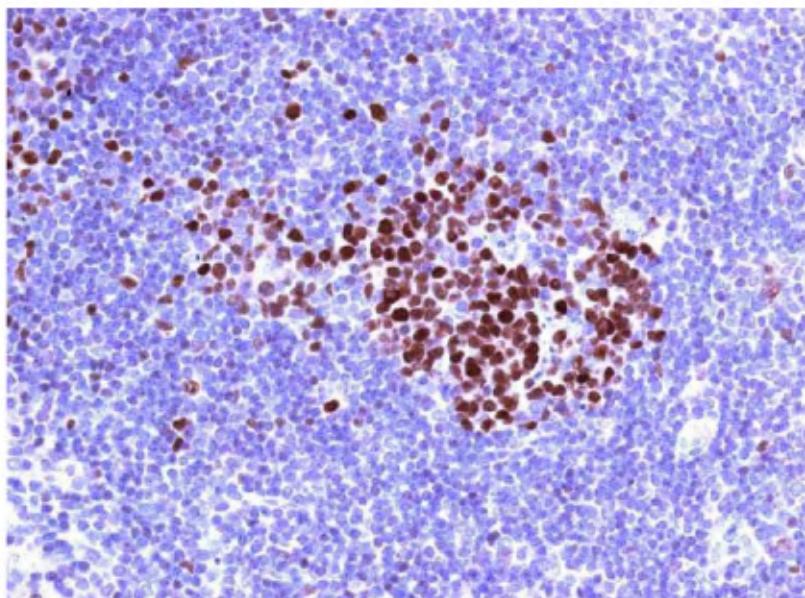
- **M-IHC-P-mouse immunohistochemistry (paraffin):** Antibody GI191E can be used to detect BCL6 protein in mouse tissues.

Tissue sample: Mouse lymph node

Dilution: 1:50

Antibody incubation: 30 minutes

Method used: Discovery Xt (Ventana) CC1 OmniMap Rabbit.



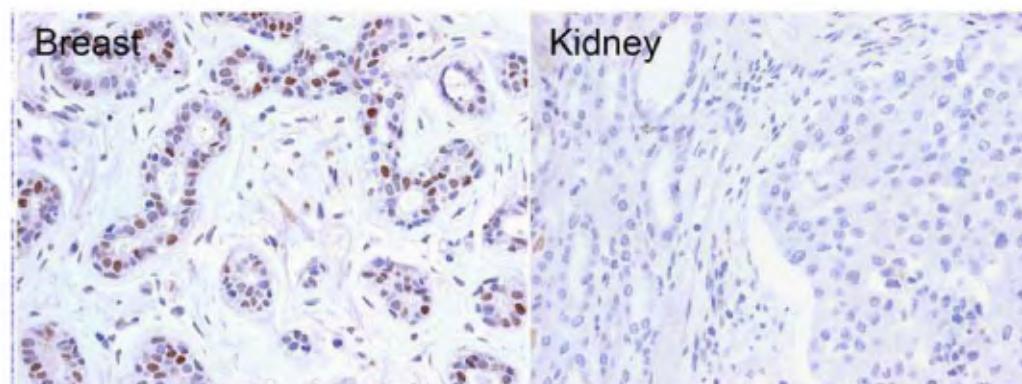
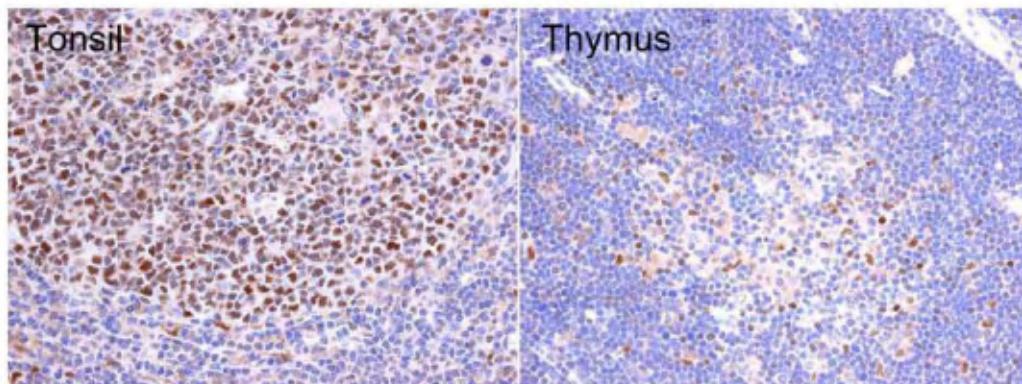
BCL6 validation file (Lot 152)

- **IHC-P-Immunohistochemistry (paraffin):** GI191E antibody can be used to detect BCL6 protein in paraffin embedded tissue samples.

Tissue sample: Human Tonsil, thymus, breast and kidney.

Dilution: 1:350

Method used: 20 min ER2 (Tris-EDTA) kit Novolink (Machine BondMax Leica)



- **IF-Immunofluorescence:** Not working

- **FC-Flow cytometry:** Not done

Publications

Verdes-Montenegro JF, Garcia JF, Maestre L, Lucas-Campeno E, Sanchez-Verde L, Romero-Chala S, Piris MA, Roncador G. Genetic Immunization: a New Monoclonal Antibody for the Detection of BCL-6 Protein in Paraffin Sections. *J Histochem Cytochem.* 2006 54(1):31-8.

Purified anti-mouse/human Bcl-6 Antibody

Catalog# / Size 648302 / 100 µg
648301 / 25 µg

Clone IG191E/A8 (See other available formats)

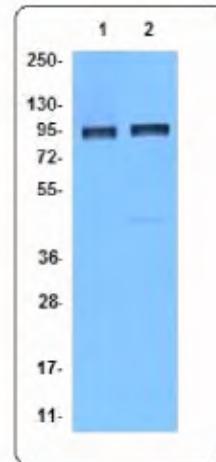
Other Names B-cell lymphoma 6, BCL-5, LAZ3, BCL6A, ZNF51, ZBTB27

Isotype Mouse IgG1

Ave. Rating ★★★★ 0 reviews

Description

B-cell lymphoma 6 (Bcl-6), is an 80 kD homodimer and member of the BTB-POZ zinc finger family. It consists of one BTB (POZ) domain and six C2H2-type zinc fingers. Bcl-6 is a transcriptional repressor as well as a master regulator of germinal center reaction. On B cells, Bcl-6 induces proliferation, antibody class switching and affinity maturation, while inhibits its differentiation to plasma cells. On T cells, Bcl-6 induces its differentiation to T_{FH}. This molecule is also expressed in some B cell lymphomas and breast cancer cells.



Raji (lane 1) and A20 (lane 2) cell extracts were resolved by electrophoresis, transferred to nitrocellulose and probed with anti- Bcl -6 monoclonal antibody, IG191E/A8. Proteins were visualized using goat anti-mouse secondary antibody conjugated to HRP and a chemiluminescent system.

Reactivity Human, Mouse

Immunogen Plasmid vector containing cDNA of the Bcl-6 gene

Formulation Phosphate-buffered solution, pH 7.2, containing 0.09% sodium azide.

Preparation The antibody was purified by affinity chromatography.

Concentration 0.5 mg/ml

Storage & Handling The antibody solution should be stored undiluted between 2°C and 8°C.

Application WB - Quality tested
IHC - Reported in the literature

Recommended Usage Each lot of this antibody is quality control tested by Western blotting. For Western blotting, the suggested use of this reagent is 0.25 µg per ml. It is recommended that the reagent be titrated for optimal performance for each application.

Application Notes This clone is also known as GI191E/A8. Additional reported applications (for the relevant formats) include: immunohistochemical staining of formalin fixed, paraffin embedded tissue sections¹, Western blotting¹, and immunoprecipitation¹.

Application References 1. Garcia JF, et al. 2006. *J. Histochem Cytochem.* 54:31.

(PubMed link indicates BioLegend citation) Publication Library

Antigen Details

Structure Member of the BTB-POZ zinc finger family, 80 kD, homodimer, 1 BTB (POZ) domain, 6 C2H2-type zinc fingers

Distribution Germinal center B cells, follicular helper T cells (TFH), B cell lymphomas, breast cancer cells

Function Transcription factor, master regulator of germinal center reaction

Interaction BLIMP-1

- Antigen References**
1. Ye BH, et al. 1993. *Science* 262:747.
 2. Baron BW, et al. 1993. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5262.
 3. Onizuka T, et al. 1995. *Blood* 86:28.
 4. Johnston RJ, et al. 2009. *Science* 325:1006.
 5. Kitano M, et al. 2011. *Immunity* 34:961.
 6. Baumjohann D, et al. 2011. *J. Immunol.* 187:2089.

7. Tran TH, et al. 2010. *Cancer Res.* 70:1711.

Gene ID	604
	12053

UniProt	View information about Bcl-6 on UniProt.org
---------	---

Documentation

[Technical data sheet](#)



[Certificate of Analysis](#)



[Safety Data Sheet](#)

Related Protocols

[Western Blotting Protocol](#)

Related FAQs

There are no FAQs for this product.

Related Categories

[Immunology > Mouse Immunology > B Cells > Bcl-6 >](#)

[Antibodies and More > Cell Biology > Transcriptional Regulators > Bcl-6 >](#)

[Antibodies and More > Cell Biology > Antigens A-Z > Bcl-6 >](#)

Other Formats

Description	Clone	Applications
PE anti-mouse/human Bcl-6	IG191E/A8	ICFC
Alexa Fluor® 647 anti-mouse/human Bcl-6	IG191E/A8	ICFC
Alexa Fluor® 594 anti-mouse/human Bcl-6	IG191E/A8	IHC-P

For research use only. Not for diagnostic use. Not for resale. BioLegend will not be held responsible for patent infringement or other violations that may occur with the use of our products.

*These products may be covered by one or more Limited Use Label Licenses (see the BioLegend Catalog or our website, www.biologen.com/ordering#license). BioLegend products may not be transferred to third parties, resold, modified for resale, or used to manufacture commercial products, reverse engineer functionally similar materials, or to provide a service to third parties without written approval of BioLegend. By use of these products you accept the terms and conditions of all applicable Limited Use Label Licenses. Unless otherwise indicated, these products are for research use only and are not intended for human or animal diagnostic, therapeutic or commercial use.

BioLegend Inc., 9727 Pacific Heights Blvd, San Diego, CA 92121 www.biologen.com
Toll-Free Phone: 1-877-Bio-Legend (246-5343) Phone: (858) 768-5800 Fax: (877) 455-9587

BCL6 Monoclonal Antibody (GI191E), eBioscience™

Catalog Number 14-9887-82

Product data sheet

Details		Species Reactivity	
Size	100µg	Tested species reactivity	Human, Mouse
Host/Isotope	Mouse / IgG1, kappa	Published species reactivity	Not Applicable
Class	Monoclonal	Tested Applications	Dilution *
Type	Antibody	Immunohistochemistry (Paraffin) (IHC (P))	5 µg/ml
Clone	GI191E	Western Blot (WB)	5 µg/mL
Conjugate	Unconjugated	Published Applications	
Form	Liquid	Miscellaneous PubMed (MISC)	See 3 publications below
Concentration	0.5 mg/mL	* Suggested working dilutions are given as a guide only. It is recommended that the user titrate the product for use in their own experiment using appropriate negative and positive controls.	
Purification	Affinity chromatography		
Storage buffer	PBS, pH 7.2		
Contains	0.09% sodium azide		
Storage Conditions	4° C		

Product specific information

Description: This GI191E monoclonal antibody reacts with mouse and human Bcl-6, which is also known as B-cell lymphoma 6. A member of the POZ family of transcriptional repressors, Bcl-6 is expressed most abundantly in germinal center B cells, as well as in differentiating and activated B cells. This 79-kDa protein is essential for germinal center B cell proliferation and survival. Moreover, during B cell development, Bcl-6 plays an important role in promoting pre-B cell survival to enable the generation of a diverse B cell repertoire. Moreover, Bcl-6 is expressed constitutively in diffuse large B cell lymphomas (DLBCLs), Burkitt's lymphoma, and non-Hodgkin's lymphoma. Reports also suggest expression of Bcl-6 in CD4+ T follicular helper cells and memory T cells. Bcl-6 has been reported to be antagonized by Blimp-1.

Applications Reported: This GI191E antibody has been reported for use in immunoblotting (WB) and immunohistochemistry (FFPE).

Applications Tested: This GI191E antibody has been tested by immunoblotting of reduced cell lysate prepared from A20 cells and by immunohistochemistry on human tissue using high pH antigen retrieval. This antibody can be used at less than or equal to 5 µg/mL. It is recommended that the antibody be carefully titrated for optimal performance in the assay of interest.

Background/Target Information

Bcl-6 proto-oncogene product (a Kruppel-type zinc-finger protein) is mainly expressed in normal germinal center B cells and related lymphomas. Bcl-6 is involved in chromosome rearrangements at 3q27 in non-Hodgkin's lymphomas and Bcl-6 rearrangements have been detected in 33%-45% of diffuse large B cell lymphomas. Bcl-6 has been detected immunohistochemically in follicular lymphomas, diffuse large B cell lymphomas, Burkitt's lymphomas and in nodular, lymphocyte predominant Hodgkin's disease.

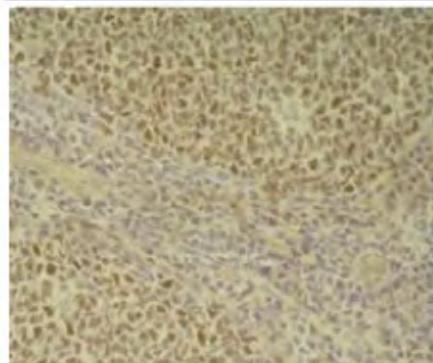
For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures. Not for resale without express authorization.

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures. Not for resale without express authorization.

Products are warranted to operate or perform substantially in conformance with published Product specifications in effect at the time of sale, as set forth in the Production documentation, specifications and/or accompanying package inserts ("Documentation"). No claim of suitability for use in applications regulated by FDA is made. The warranty provided herein is valid only when used by properly trained individuals. Unless otherwise stated in the Documentation, this warranty is limited to one year from date of shipment when the Product is subjected to normal, proper and intended usage. This warranty does not extend to anyone other than the Buyer. Any model or sample furnished to Buyer is merely illustrative of the general type and quality of goods and does not represent that any Product will conform to such model or sample.

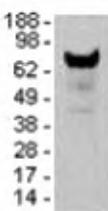
NO OTHER WARRANTIES, EXPRESS OR IMPLIED, ARE GRANTED INCLUDING WITHOUT LIMITATION, IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY, FITNESS FOR ANY PARTICULAR PURPOSE, OR NON-INFRINGEMENT. BUYER'S EXCLUSIVE REMEDY FOR NON-COMPLYING PRODUCTS DURING THE WARRANTY PERIOD IS LIMITED TO REPAIR, REPLACEMENT OR REFUND FOR THE NON-COMPLYING PRODUCT(S) AT SELLER'S SOLE OPTION. THERE IS NO OBLIGATION TO REPAIR, REPLACE OR REFUND FOR PRODUCTS AS THE RESULT OF (I) ACCIDENT, DISASTER OR EVENT OF FORCE MAJEURE, (II) MISUSE, FAULT OR NEGLIGENCE OF OR BY BUYER, (III) USE OF THE PRODUCTS IN A MANNER FOR WHICH THEY WERE NOT DESIGNED, OR (IV) IMPROPER STORAGE AND HANDLING OF THE PRODUCTS. Unless otherwise expressly stated on the Product or in the documentation accompanying the Product, the Product is intended for research only and is not to be used for any other purpose, including without limitation, unauthorized commercial uses, in vitro diagnostic uses, ex vivo or in vivo therapeutic uses, or any type of consumption by or application to human or animals.

Product Images For BCL6 Monoclonal Antibody (GI191E), eBioscience™



BCL6 Antibody (14-9887-82)

Immunohistochemistry of formalin-fixed paraffin embedded human tonsil stained with 5 µg/mL Anti-Human/Mouse Bcl-6 Purified followed by Anti-Mouse IgG Biotin, Avidin HRP, and DAB visualization. Nuclei are counterstained with hematoxylin.



BCL6 Antibody (14-9887-82)

Immunoblotting of reduced A20 cell lysate with 5 µg/ml of Anti-Mouse Bcl-6 Purified antibody. Bands were visualized using Anti-Mouse IgG HRP.

PubMed References For BCL6 Monoclonal Antibody (GI191E), eBioscience™

3 Miscellaneous PubMed References

Species / Dilution	Summary
Not Applicable / Not Cited	<p>The Journal of experimental medicine (Jun 2010; 207: 1209) "BCL6 is critical for the development of a diverse primary B cell repertoire." Author(s):Duy C,Yu JJ,Nahar R,Swaminathan S,Kweon SM,Polo JM,Valls E,Klemm L,Shojaee S,Cerchietti L,Schuh W,Jäck HM,Hurtz C,Ramezani-Rad P,Herzog S,Jumaa H,Koeffler HP,de Alborán IM,Melnick AM,Ye BH,Müschen M PubMed Article URL:http://dx.doi.org/10.1084/jem.20091299</p>
Not Applicable / Not Cited	<p>Science (New York, N.Y.) (Aug 2009; 325: 1006) "Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation." Author(s):Johnston RJ,Poholek AC,DiToro D,Yusuf I,Eto D,Barnett B,Dent AL,Craft J,Crotty S PubMed Article URL:http://dx.doi.org/10.1126/science.1175870</p>
Not Applicable / Not Cited	<p>The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society (Jan 2006; 54: 31) "Genetic immunization: a new monoclonal antibody for the detection of BCL-6 protein in paraffin sections." Author(s):García JF,García JF,Maestre L,Lucas E,Sánchez-Verde L,Romero-Chala S,Piris MA,Roncador G PubMed Article URL:http://dx.doi.org/10.1369/jhc.5A6646.2005</p>

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures. Not for resale without express authorization.

Products are warranted to operate or perform substantially in conformance with published Product specifications in effect at the time of sale, as set forth in the Production documentation, specifications and/or accompanying package inserts ("Documentation"). No claim of suitability for use in applications regulated by FDA is made. The warranty provided herein is valid only when used by properly trained individuals. Unless otherwise stated in the Documentation, this warranty is limited to one year from date of shipment when the Product is subjected to normal, proper and intended usage. This warranty does not extend to anyone other than the Buyer. Any model or sample furnished to Buyer is merely illustrative of the general type and quality of goods and does not represent that any Product will conform to such model or sample.

NO OTHER WARRANTIES, EXPRESS OR IMPLIED, ARE GRANTED INCLUDING WITHOUT LIMITATION, IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY, FITNESS FOR ANY PARTICULAR PURPOSE, OR NON-INFRINGEMENT. BUYER'S EXCLUSIVE REMEDY FOR NON-COMFORMING PRODUCTS DURING THE WARRANTY PERIOD IS LIMITED TO REPAIR, REPLACEMENT OR REFUND FOR THE NON-COMFORMING PRODUCT(S) AT SELLER'S SOLE OPTION. THERE IS NO OBLIGATION TO REPAIR, REPLACE OR REFUND FOR PRODUCTS AS THE RESULT OF (I) ACCIDENT, DISASTER OR EVENT OF FORCE MAJEURE, (II) MISUSE, FAULT OR NEGLIGENCE OF OR BY BUYER, (III) USE OF THE PRODUCTS IN A MANNER FOR WHICH THEY WERE NOT DESIGNED, OR (IV) IMPROPER STORAGE AND HANDLING OF THE PRODUCTS. Unless otherwise expressly stated on the Product or in the documentation accompanying the Product, the Product is intended for research only and is not to be used for any other purpose, including without limitation, unauthorized commercial uses, in vitro diagnostic uses, ex vivo or in vivo therapeutic uses, or any type of consumption by or application to human or animals.



Bcl6 antibody (mAb)

Catalog No: 61193, 61194

Clone: IG191E

Isotype: IgG1

Application(s): IHC, WB

Reactivity: Human

Purification: Protein G Chromatography

Host: Mouse

Concentration: 1 µg/µl

Quantity: 100 µg, 10 µg

Molecular Weight: 80 kDa

Background: Bcl6 (B-cell lymphoma 6 protein, Bcl5, LAZ3, ZBTB27, ZNF51) is sequence-specific transcriptional repressor that is required for the formation of lymph node germinal centers (GC). Bcl6 is a member of the BTB-POZ family of transcriptional regulators and contains six Kruppel-type zinc fingers. The POZ domain in the amino terminus of Bcl6 is involved in the recruitment of corepressor proteins including NCoR, BCoR, SMRT, Mi-2/NURD and several HDACs. Bcl6 promotes proliferative expansion of B-cells in the germinal center through repression of genes regulating cell cycle and differentiation. Bcl6 also suppresses the DNA damage response, to prevent class-switch recombination being repaired. Unregulated expression of Bcl6 is involved in the development of many B-cell lymphomas.

Immunogen: This Bcl6 antibody was raised against a full-length protein corresponding to human Bcl6.

Buffer: Purified IgG in PBS with 30% glycerol and 0.035% sodium azide. Sodium azide is highly toxic.

Application Notes:

Published Applications:

IHC

WB

See references for experimental details. Individual optimization may be required.

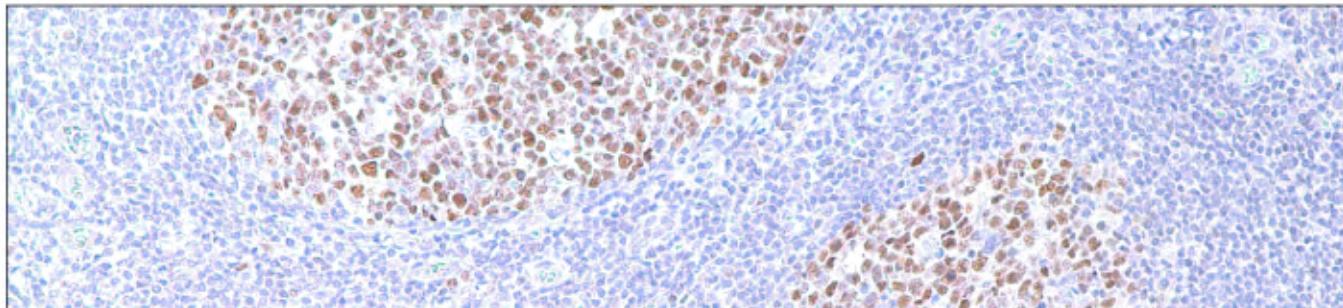
References: Bcl6 antibody has been cited in one or more publications. To see an up-to-date listing of papers that describe its use, please go to www.activemotif.com/catalog/details/61193.

Storage and Guarantee: Antibodies in solution can be stored at -20°C for 2 years. Avoid repeated freeze/thaw cycles and keep on ice when not in storage. This product is guaranteed for 6 months from date of receipt.

This product is for research use only and is not for use in diagnostic procedures.

bcl-6 (GI191E/A8)

Mouse Monoclonal Antibody



DISPONIBILIDAD DEL PRODUCTO

Ventana	REF	Roche #	Descripción
760-4241		05269008001	Dispensador de 50 pruebas

DEFINICIONES DE LOS SÍMBOLOS

A	ascitis
S	sobrenadante

E	suero
KEY-CODE	código

USO PREVISTO

El Anti-bcl-6 (GI191E/A8) Mouse Monoclonal Antibody está destinado al uso en laboratorio para la detección de la proteína BCL6 en tejido fijado con formol y embebido en parafina, teñido en un módulo de tinción de portaobjetos automatizado inmunohistoquímico (IHQ) VENTANA BenchMark. Este producto debe interpretarlo un patólogo cualificado teniendo en cuenta además el análisis histológico, la información clínica relevante y los controles pertinentes. Este anticuerpo está indicado para usarse en diagnósticos *in vitro* (IVD).

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

BCL6 es un gen regulador transcripcional que codifica una proteína de dedo de zinc nuclear del aminoácido 706. Los anticuerpos de esta proteína tiñen las células (tanto las benignas como las malignas) del centro germinal de los folículos linfoides y las células malignas interfoliculares del linfoma folicular, de los linfomas difusos de células B grandes y del linfoma de Burkitt, así como la mayoría de las células tumorales del linfoma de Hodgkin nodular con predominancia linfocitaria.¹⁻³ El Anti-BCL6 raramente tiñe el linfoma de células del manto y el linfoma MALT.² La expresión de la BCL6 se observa en aproximadamente el 68 % de los linfomas anaplásicos de células grandes (ALCL) ALK+ y en el 28 % de los ALCL ALK-; en el linfoma de células NK/T (27 %), en el linfoma de células T periférico no especificado (8,6 %) y en el linfoma linfoblástico de células T (9,1 %).⁴ La expresión de

la BCL6 también puede observarse en el linfoma angioinmunoblastico de células T (66 %-96 %).⁵

PRINCIPIOS Y PROCEDIMIENTOS

El anticuerpo primario indicado (760-4241) puede utilizarse como anticuerpo primario para la tinción inmunohistoquímica de cortes de tejido fijado con formol y embebido en parafina. En general, la tinción inmunohistoquímica junto con el sistema de detección con estreptavidina-biotina permite la visualización de抗ígenos a través de la aplicación secuencial de un anticuerpo específico (anticuerpo primario) al antígeno, un anticuerpo secundario (anticuerpo de unión) al anticuerpo primario, un complejo enzimático y un sustrato cromogénico con etapas de lavado intermedias. Alternativamente se puede utilizar un sistema de detección sin biotina. La activación enzimática del cromógeno da lugar a un producto de reacción visible en el sitio del antígeno. La muestra puede entonces contrateñirse y aplicarse un cubreportaobjetos. Los resultados se interpretan utilizando un microscopio óptico y ayuda en el diagnóstico diferencial de los procesos patofisiológicos que pueden estar asociados o no a un antígeno en particular.

El anticuerpo primario indicado (760-4241) está diluido óptimamente para ser compatible con los kits de detección y el módulo de tinción de portaobjetos automatizado Ventana Roche. Cada paso del protocolo de tinción incluye la incubación durante un tiempo determinado y a una temperatura concreta. Al final de cada paso de incubación se aclaran los cortes en el módulo de tinción automatizado Ventana Roche, para detener así la reacción y eliminar el material no ligado que podría impedir la reacción deseada en los pasos posteriores. Para minimizar la evaporación de los reactivos acuosos del portaobjetos que contiene la muestra, se aplica una solución de cubreobjetos en el módulo de tinción. Para obtener información más detallada sobre el funcionamiento del instrumento, consulte el Manual del usuario del módulo de tinción automatizado Ventana Roche.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos suministrados

Un dispensador del anticuerpo primario indicado (760-4241) contiene suficiente reactivo prediluido para 50 pruebas. El anticuerpo está diluido en tampón Tris, pH 7,3-7,7, con 1% BSA y <0,1% de azida de sodio.

El rango de concentración de inmunoglobulina para este producto es 0,01-1,0 µg/ml.

En la etiqueta del producto se indica la concentración de inmunoglobulina.

Isotipo: IgG,

Consulte la etiqueta del producto para conocer los datos sobre la fuente del anticuerpo.

Reconstitución, mezcla, dilución y titulación

Este anticuerpo se ha optimizado para su uso en un módulo de tinción automatizado Ventana Roche junto a los sistemas de detección Ventana Roche. No se requiere su reconstitución, mezcla, dilución ni titulación. Las diluciones adicionales pueden producir la pérdida de la tinción del antígeno. El usuario debe validar cualquier cambio que se produzca. Las diferencias en el procesamiento del tejido y en los procedimientos técnicos en el laboratorio pueden producir una variabilidad significativa en los resultados y requerir el uso regular de controles. (Consulte la sección Procedimientos de control de calidad).

Materiales y reactivos necesarios no suministrados

Los siguientes reactivos y materiales pueden ser necesarios para la tinción, pero no se incluyen con el anticuerpo primario:

1. Tejido de control positivo y negativo
2. Portaobjetos para microscopio con carga positiva
3. Horno de secado capaz de mantener una temperatura de 58-60 °C ± 5 °C
4. Etiquetas de código de barras (etiquetas de código de barras adecuadas para el control negativo y para el anticuerpo primario que se está analizando)
5. Cubetas o baños de tinción
6. Cronómetro
7. Amplificador (cuando sea pertinente)
8. Xileno o sustituto de xileno
9. Alcohol reactivo o etanol
10. Agua desionizada o destilada
11. Módulos de tinción automatizados ES®, NexES IHC®, BenchMark®, BenchMark® XT y BenchMark® ULTRA
12. Kits de detección iVIEW™ DAB (preferido), ultraView™, AEC, V Red (ALK PHOS) y Enhanced V Red
13. Software específico para el sistema de detección (módulo de tinción automatizado ES® solamente)
14. Solución de lavado APK (módulos de tinción automatizados ES® y NexES IHC®)
15. Solución Liquid Coverslip™ (módulos de tinción automatizados ES® y NexES IHC®)
16. Solución EZ Prep™ (módulos de tinción automatizados BenchMark®, BenchMark® XT y BenchMark® ULTRA)

17. Tampón de reacción (módulos de tinción automatizados BenchMark®, BenchMark® XT y BenchMark® ULTRA)
18. LCS (Módulos de tinción automatizados BenchMark®, BenchMark® XT y BenchMark® ULTRA)
19. Hematoxilina u otra contratinclón
20. Reactivo de control negativo
21. Medio de montaje
22. Cubreobjetos
23. Microscopio óptico (40-400x)

Conservación y manipulación

Conservar a 2-8 °C. No congelar.

Para garantizar la dispensación adecuada del reactivo y la estabilidad del anticuerpo, tras cada utilización se debe volver a poner el tapón y conservar el dispensador inmediatamente en la nevera, en posición vertical.

Todos los dispensadores de anticuerpo tienen una fecha de caducidad. El reactivo es estable hasta la fecha indicada en la etiqueta siempre que se conserve correctamente. No usar el reactivo después de la fecha de caducidad para el método de conservación descrito.

No hay signos definitivos que indiquen la inestabilidad de este producto, por lo que los controles positivos y negativos deben analizarse simultáneamente con muestras desconocidas. Póngase en contacto con el servicio de atención al cliente de Cell Marque si encuentra algún indicio sospechoso de inestabilidad del reactivo.

Extracción y preparación de la muestra para su análisis

Cuando se utiliza el procedimiento habitual, los tejidos fijados en formol en tampón neutro y embebidos en parafina resultan adecuados para el uso con este anticuerpo primario cuando se utiliza con los sistemas de detección Ventana Roche y un módulo de tinción automatizado Ventana Roche (consulte la sección Materiales y reactivos necesarios no suministrados). El fijador de tejido recomendado es formol tamponado neutro al 10%. Pueden tener lugar resultados variables como consecuencia de una fijación prolongada o procesos especiales tales como la descalcificación en la preparación de la médula ósea.

Cada sección debe cortarse con el grosor apropiado (aproximadamente 3 µm) y colocarse en un portaobjetos de vidrio con carga positiva. Los portaobjetos que contienen el corte de tejido pueden secarse durante al menos 2 horas (pero no más de 24 horas) en un horno a una temperatura de 58-60 °C ± 5 °C.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Adopte las precauciones adecuadas cuando se manipulen los reactivos. Usar guantes y batas de laboratorio desechables cuando se manipulen materiales potencialmente carcinógenos o tóxicos (como xileno).
2. Evite el contacto de los reactivos con los ojos y las membranas mucosas. Si se produce el contacto con áreas sensibles, lávese con agua abundante.

3. Las muestras del paciente y todos los materiales en contacto con ellas deben tratarse como si fuesen materiales potencialmente infecciosos y desecharse con las precauciones adecuadas. Nunca pipeteear con la boca.
4. Evitar la contaminación microbiana de los reactivos, ya que podrían producirse resultados incorrectos.
5. Los tiempos y las temperaturas de incubación que no sean los que se especifican pueden dar resultados erróneos.
6. Los reactivos han sido diluidos óptimamente por lo que una dilución adicional podría producir la pérdida de tinción del antígeno. El usuario debe validar cualquier cambio que se produzca.
7. Este producto no se clasifica como sustancia peligrosa cuando se usa según las instrucciones. El conservante del reactivo es inferior al 0,1% de acida sódica y no cumple los criterios de la OSHA para sustancias peligrosas a la concentración indicada. Consulte la hoja de datos de seguridad de los materiales.
8. El usuario debe validar cualquier condición de almacenamiento que no sea una de las especificadas en el prospecto.
9. El disolvente puede incluir albúmina de suero bovino y el sobrenadante puede contener suero bovino. Los productos que contienen suero fetal bovino y los productos que contienen albúmina de suero bovino se compran a los proveedores comerciales. Los certificados de origen de la fuente animal utilizada en estos productos obran en el archivo de Cell Marque. Los certificados aseguran que las fuentes bovinas provienen de países con riesgo mínimo de BSE y relacionan como fuentes de bovinos EE. UU. y Canadá.
10. Como con cualquier producto proveniente de fuentes biológicas, deberán emplearse procedimientos de manipulación apropiados.

INSTRUCCIONES DE USO

Procedimiento detallado

Los anticuerpos primarios de Cell Marque se han desarrollado para su uso en módulos de tinción automatizados Ventana Roche junto a los kits de detección Ventana Roche y sus accesorios.

Instrucciones para la preparación, manipulación y conservación del dispensador

Preparación para el uso:

Lugar de uso: para instrumentos automatizados NexES® IHC, Serie BenchMark® y Discovery®, software de versión 8.0 y superior.

1. Retirada de la brida de transporte

Para retirar la brida de transporte (mostrada en la Figura A) quite el tapón de la boquilla, mantenga el dispensador en vertical y tire de la pestaña de la brida para soltarla de cada extremo. NO tape la punta de la boquilla pues podría dañar el dispensador permanentemente. NO comprima el dispensador mientras retira la brida pues podría desperdiciar reactivo. Tire la brida de transporte.

2. Preparación del dispensador para su uso

Retire el tapón de la boquilla y colóquelo en el soporte para el tapón de la boquilla. Puede haber fluido dentro del tapón de la boquilla. Instale el dispensador en el carrusel de reactivos. El

dispensador en línea ha sido diseñado para ser "Preparado para usar" por el software NexES®, Versión 8.0 o superior. Antes de cada ejecución, el software detectará un nuevo dispensador en el carrusel y lo cebará automáticamente. El cebado manual del dispensador no es necesario y no deberá realizarse NUNCA pues podría desperdiciar reactivo y reducir el número de dispensaciones disponibles.

Nota - Todas las instalaciones de software anteriores: después de retirar la brida de transporte, quite el tapón de la boquilla y CARGUE EL DISPENSADOR BOMBEANDO RÁPIDAMENTE de 3 a 4 VECES, manteniendo el dispensador en posición vertical. La carga solo es necesaria antes de usarlo por primera vez. (Consulte la sección Examinar el cebado antes de usar.)

3. Manipulación y conservación del dispensador

Para asegurar un funcionamiento fiable, el dispensador debe estar siempre tapado cuando no se esté utilizando y NUNCA deberá ser dispensado manualmente. (Consulte la sección qué hacer y qué evitar.)

Qué hacer y qué evitar

QUÉ HACER:

1. Controle la cámara de cebado y el menisco antes de cada uso. (Consulte la sección Examinar el cebado antes de usar.)
2. Conserve el tapón de la boquilla en el dispensador. Se proporciona un soporte.
3. Tape el dispensador cuando no lo esté utilizando para evitar la evaporación. Los dispensadores montados en la cubeta de reactivos pueden taparse (desde abajo de la bandeja) cuando no se estén utilizando.
4. Guarde los dispensadores en posición vertical en una gradilla y en el carrusel de reactivos.
5. Cuando monte el dispensador en el carrusel, agarre el acoplador para evitar cualquier dispensación manual accidental.

QUÉ EVITAR:

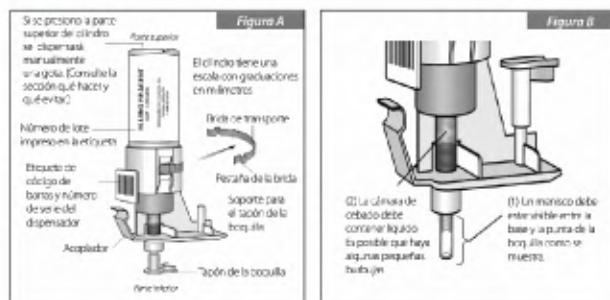
1. No dispense manualmente cuando esté invertido (al revés). Se perderá el cebado y puede ser imposible de restablecer.
2. No dispense manualmente con el tapón de la boquilla colocado. Esto puede dañar permanentemente el dispensador.
3. Esto no es necesario y desperdicia reactivo. Esto no es necesario y desperdicia reactivo.
4. No mantenga el cuerpo en posición baja. Podría escapar fluido del dispensador cuando se comprima el cuerpo.
5. No apile caruseles con dispensadores instalados. Esto puede hacer que los dispensadores goteen.

Examinar el cebado antes de usar:

Quite el tapón de la boquilla y consulte la Figura B.

El dispensador está listo para usar cuando:

1. Hay un menisco en el área mostrada en la Figura B.
2. La cámara de cebado contiene líquido.



Los procedimientos para teñir en los módulos de tinción de portaobjetos automatizados Ventana Roche son los siguientes. Para instrucciones más detalladas y otras opciones de protocolo, consulte el manual del usuario.

Protocolos de tinción recomendados para 760-4241:

ultraView™:

1. Cargar los portaobjetos, anticuerpos y los dispensadores de kit de detección ultraView™ en el instrumento BenchMark®*.
 2. Seleccione el tratamiento previo estándar CC1.
 3. La incubación del anticuerpo debe fijarse para 32 minutos a 37°C.
 4. Inicie la sesión.
 5. Una vez se haya completado la sesión de tinción, extraiga los portaobjetos del instrumento y enjuáguelos bien con tampón de lavado.
 6. Cubreobjetos.

PROCEDIMIENTOS DE CONTROL DE CALIDAD

Control de tejido positivo

Cada vez que se realice el procedimiento de tinción, debe procesarse un control positivo del tejido. Este tejido puede contener células o componentes del tejido de tinción positiva y negativa y servir como tejido de control positivo y negativo. Los tejidos de control deben ser muestras frescas de autopsia, biopsia o cirugía preparadas o fijadas con la mayor brevedad con un proceso idéntico al de los cortes en estudio. El uso de un corte de tejido fijado o procesado de forma diferente a la muestra en estudio servirá para el control de todos los reactivos y pasos del método excepto la fijación y el procesamiento del tejido.

Un tejido con una tinción positiva débil es más adecuado para un control de calidad óptimo y para detectar niveles pequeños de degradación del reactivo. El control de tejido positivo para el anticuerpo primario indicado (760-4241) puede incluir lo siguiente:

Amígdalas	Nuclear
-----------	---------

Los controles de tejido positivos conocidos solo se deben usar para monitorizar el comportamiento correcto de los tejidos procesados y los reactivos de la prueba, y no como ayuda para establecer un diagnóstico específico de las muestras del paciente. Si los controles positivos del

tejido no muestran una tinción positiva apropiada, los resultados de las muestras en estudio se deben considerar no válidos.

Control de tejido negativo

El mismo tejido utilizado para el control de tejido positivo se puede utilizar en el control de tejido negativo. La variedad de tipos de células presentes en la mayoría de los cortes de tejidos ofrece sitios de control negativo internos, pero esto debe verificarlo el usuario. Los componentes que no se tiñen deben demostrar la ausencia de tinción específica y proporcionar una indicación de tinción de fondo no específica. Si se produce una tinción específica en los sitios de control de tejido negativo, los resultados obtenidos con las muestras del paciente deben considerarse no válidas.

Discrepancias inexplicables

Discrepancias inexplicables
Deberá comunicar inmediatamente las discrepancias inexplicables de los controles a su distribuidor local de Ventana Roche. Si los resultados del control de calidad no cumplen las especificaciones, los resultados del paciente no son válidos. Véase la sección Resolución de problemas de este prospecto. Identifique y corrija el problema; a continuación, repita todo el procedimiento con las muestras del paciente.

Reactivos de control negativo

Se debe utilizar un reactivo de control negativo para cada muestra para ayudar a interpretar los resultados. Para evaluar una tinción no específica se utiliza un reactivo de control negativo en lugar del anticuerpo primario. Se deberá tratar el portaobjetos con el reactivo de control negativo haciendo coincidir las especies huéspedes del anticuerpo primario e idóneamente con la misma concentración de IgG. El periodo de incubación para el reactivo de control negativo deberá ser igual que el periodo de incubación del anticuerpo primario.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

El procedimiento de inmunoensayo en los módulos de tinción de portaobjetos automatizados Ventana Roche causa la precipitación de un producto de reacción coloreado en los sitios del antígeno localizados por el anticuerpo primario. Consulte en el prospecto correspondiente del sistema de detección las reacciones de color esperadas. Un patólogo cualificado experimentado en procedimientos de inmunohistoquímica debe evaluar los controles de tejido positivos y negativos antes de interpretar los resultados.

Control de tejido positivo

El control de tejido positivo teñido debe examinarse primero para determinar que todos los reactivos funcionan adecuadamente. La presencia de un producto de reacción con el color adecuado dentro de las células diana es indicativa de una reactividad positiva. Consulte en el prospecto del sistema de detección utilizado las reacciones de color esperadas. Según sea la duración de la incubación y la potencia de la hematoxilina empleada, la contratinción dará como resultado una coloración azul de pálida a oscura de los núcleos celulares. Una contratinción excesiva o incompleta puede comprometer la interpretación adecuada de los resultados. Si los controles de tejidos

positivos no muestran una tinción positiva apropiada, los resultados de las muestras en estudio se deben considerar no válidos.

Control de tejido negativo

El control de tejido negativo debe examinarse después del control de tejido positivo para verificar la marcación específica del antígeno diana por el anticuerpo primario. La ausencia de tinción específica en el control de tejido negativo confirma la ausencia de reactividad cruzada del anticuerpo con las células o los componentes celulares. Si se produce una tinción específica en el control de tejido negativo, los resultados obtenidos con la muestra del paciente se consideran no válidos. La tinción no específica, si la hay, tendrá un aspecto difuso. También se puede observar una ligera tinción específica esporádica del tejido conjuntivo en cortes de tejidos que no estén fijados óptimamente. Para la interpretación de los resultados de la tinción deben usarse células intactas. Las células necróticas o degeneradas muestran una tinción no específica.

Tejido del paciente

Las muestras del paciente se deben examinar al final. La intensidad de la tinción positiva se debe valorar en el contexto de cualquier tinción de fondo del control de reactivo negativo. Como en cualquier prueba de inmunohistoquímica, un resultado negativo significa que el antígeno en cuestión no se ha detectado, no que el antígeno esté ausente de las células o del tejido analizado. Un panel de anticuerpos puede ayudar a identificar reacciones negativas falsas (consulte la sección Sumario de resultados esperados). La morfología de cada muestra del tejido también debe examinarse utilizando un corte con tinción de hematoxilina y eosina al interpretar cualquier resultado de inmunohistoquímica. Un patólogo cualificado debe interpretar los resultados morfológicos del paciente y sus datos clínicos pertinentes.

LIMITACIONES

1. Este reactivo es "de exclusivo uso profesional", ya que la inmunohistoquímica es un proceso diagnóstico de varias etapas que requiere una formación especializada en la selección de los reactivos, tejidos, fijación y procesamiento apropiados; la preparación del portaobjetos de inmunohistoquímica y la interpretación de los resultados de la tinción.
2. Para uso exclusivo de laboratorio.
3. Para diagnóstico *in vitro*.
4. La tinción de los tejidos depende de la manipulación y el procesamiento de los mismos antes de la tinción. Una fijación, congelación, descongelación, lavado, secado, calentado o corte inadecuados o la contaminación con otros tejidos o líquidos puede producir artefactos, bloqueo del anticuerpo o resultados falsos negativos. Los resultados inconsistentes pueden ser consecuencia de las variaciones en los métodos de fijación y embebido, así como de irregularidades inherentes dentro del tejido.
5. Una contratinción excesiva o incompleta puede comprometer la interpretación adecuada de los resultados.

6. La interpretación clínica de una tinción positiva o de su ausencia debe evaluarse en el contexto de la historia clínica, la morfología, otros criterios histopatológicos, así como otras pruebas diagnósticas. Este anticuerpo está diseñado para utilizarlo en un panel de anticuerpos. Es responsabilidad de un patólogo cualificado familiarizarse con los anticuerpos, reactivos y métodos usados para obtener una preparación con tinción. La tinción se debe realizar en un laboratorio certificado con la supervisión de un anatómopatólogo responsable de la revisión de los portaobjetos teñidos y de la verificación de la idoneidad de los controles negativos y positivos.
7. Cell Marque provee anticuerpos en una dilución óptima para usar como se indica. Cualquier desviación de los procedimientos recomendados del método puede invalidar los resultados esperados. Se deben utilizar y documentar los controles apropiados. Los usuarios que se desvían de los procedimientos recomendados del método deben aceptar su responsabilidad en la interpretación de los resultados del paciente en esas circunstancias.
8. Este producto no está diseñado para utilizarlo en citometría de flujo; no se han determinado las características del rendimiento.
9. Los reactivos pueden mostrar reacciones inesperadas en tejidos no estudiados previamente. No puede excluirse completamente la posibilidad de reacciones inesperadas, incluso en grupos de tejidos analizados, debido a la variabilidad biológica de la expresión del antígeno en neoplasias u otros tejidos patológicos. Póngase en contacto con el servicio de atención al cliente de Cell Marque ante cualquier reacción inesperada documentada.
10. Los tejidos de personas infectadas con el virus de la hepatitis B y que contengan antígeno de superficie (HBsAg) pueden mostrar una tinción no específica con peroxidasa de rábano.
11. Cuando se utilizan en pasos de bloqueo, los sueros normales procedentes del mismo origen animal que los antisueros secundarios pueden provocar resultados de falsos negativos o falsos positivos debido al efecto de los autoanticuerpos o anticuerpos naturales.
12. Pueden verse resultados de falsos positivos debido a la unión de proteínas o productos de reacción del sustrato por mecanismos no inmunológicos. También pueden estar causados por la actividad de la pseudoperoxidasa (eritrocitos), actividad de la peroxidasa endógena (citocromo C) o biotina endógena (ejemplo: hígado, cerebro, mama, riñón) dependiendo del tipo de técnica de inmunotinción empleada.
13. Como en cualquier prueba de inmunohistoquímica, un resultado negativo significa que el antígeno no se ha detectado, no que el antígeno esté ausente de las células o del tejido analizado.

Limitaciones específicas

1. El anticuerpo está optimizado para el tiempo de incubación especificado en la sección Instrucciones de uso en combinación con los kits de detección Ventana Roche y los módulos de tinción de portaobjetos automatizados Ventana Roche. Debido a las variaciones en la fijación y procesado del tejido, puede ser necesario aumentar o reducir el tiempo de incubación del anticuerpo primario en muestras individuales.

2. Los anticuerpos de Cell Marque, en combinación con sistemas de detección Ventana Roche y sus accesorios, detecta los antígenos que sobreviven al proceso habitual de fijación con formol, procesado y corte del tejido. Los usuarios que se desvían de los procedimientos recomendados del método son responsables de la interpretación y validación de los resultados del paciente.

Sumario de resultados esperados

Consulte las siguientes tablas de reactividad:

Estudio normal			
Tejido	N.º Teñido	N.º Total	Notas
Cerebro	0	6	
Córtex adrenal	0	3	
Ovarios	1	3	
Páncreas	0	3	
Paratiroides	0	3	
Pituitaria	2	3	
Testículos	1	3	
Tiroides	0	3	
Pecho	2	3	
Bazo	1	3	
Amígdalas	3	3	
Timo	0	3	
Médula ósea	0	3	
Pulmones	0	3	
Corazón	0	3	
Esófago	0	3	
Estómago	0	3	
Intestino delgado	0	3	
Colon	0	3	
Hígado	0	3	
Glándula salival	0	3	
Vesícula biliar	2	3	
Riñones	3	3	
Vejiga	2	3	
Próstata	0	3	
Útero	0	3	
Trompas de Falopio	3	3	
Uréter	2	3	
Cervix	2	3	
Músculos del esqueleto	0	3	
Músculo liso	0	3	
Piel	3	3	
Nervios periféricos	0	3	

Estudio normal			
Mesotelio	0	3	
Grasa	0	3	
Placenta	0	3	

La tinción nuclear fuerte está restringida a un subconjunto de linfocitos B mayormente localizados en centros germinales (GC). Se observó una tinción nuclear moderada en la parte de la neurohipofis, pero no en la parte de la adenohipofis y los tejidos cerebrales. Se observó una tinción nuclear de débil a ligera en el urotelio, el epitelio escamoso y el epitelio de las trompas de Falopio. Se observó tinción citoplásica en algunos tipos de tejido, que incluyen los tejidos del corazón y los riñones.

Estudio de la enfermedad del tejido			
Tejido	N.º Teñido	N.º Total	Notas
Linfoma folicular	7	7	
Linfoma difuso de células grandes B	6	8	
Linfoma de Hodgkin clásico	4	5	
Linfoma Burkitt	2	2	
Linfoma de zona marginal	2	7	
Leucemia de células pilosas	1	6	
Linfoma de célula del manto	0	6	
linfoma linfocítico pequeño	0	4	

Este anticuerpo tiñe tumores como está indicado en la literatura.

RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

- Si el control positivo muestra una tinción más débil de la esperada, deben analizarse otros controles positivos realizados en el mismo instrumento para determinar si se debe al anticuerpo primario o a uno de los reactivos secundarios comunes.
- Si el control positivo es negativo, se debe comprobar para garantizar que el portaobjetos tiene la etiqueta de código de barras adecuada. Si el portaobjetos está etiquetado correctamente, deben analizarse otros controles positivos realizados en el mismo instrumento para determinar si se debe al anticuerpo primario o a uno de los reactivos secundarios comunes. Los tejidos pueden haberse recogido, fijado o desparafinado de manera inadecuada. Debe seguirse procedimiento adecuado para la recogida, la conservación y la fijación.
- Si se produce una tinción de fondo excesiva, pueden haber niveles altos de biotina endógena. Se deberá incluir una etapa de bloqueo con biotina a no ser que se esté utilizando un sistema de detección

sin biotina, en cuyo caso ninguna biotina presente sería un factor que contribuyera a la tinción de fondo.

4. Si no se ha eliminado toda la parafina deberá repetirse el procedimiento de desparafinación.
5. Si la tinción específica del anticuerpo es demasiado intensa, debe repetirse la prueba con un tiempo de incubación reducido a intervalos de 4 minutos hasta que se logre la intensidad de tinción deseada.
6. Si los cortes de tejido lavan el portaobjetos, deben comprobarse los mismos para garantizar que tienen carga positiva.

Consultar las medidas correctoras en la sección Procedimiento detallado, el Manual del usuario del módulo de tinción automatizado o póngase en contacto con el servicio de atención al cliente de Cell Marque.

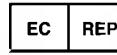
BIBLIOGRAFÍA

1. Garcia JF, et al. Genetic immunization: a new monoclonal antibody for the detection of Bcl6 protein in paraffin sections. *J Histochem Cytochem.* 2006; 54:31-8.
2. Dogan A, et al. CD10 and Bcl6 expression in paraffin sections of normal lymphoid tissue and B-cell lymphomas. *Am J Surg Pathol.* 2000; 24:846-852.
3. Kraus MD, et al. Lymphocyte predominance Hodgkin's disease: the use of Bcl6 and CD57 in diagnosis and differential diagnosis. *AM J Surg Pathol.* 2000; 24:1068-78.
4. Carbone A, et al. Bcl6 Protein expression in human peripheral T-cell neoplasms is restricted to CD30+ anaplastic large-cell lymphomas. *Blood.* 1997; 90:2445-2450.
5. Carbone A, et al. Differential expression of Bcl6, CD138/syndecan-1, and Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein-1 identifies distinct histogenetic subsets of acquired immunodeficiency syndrome-related non-Hodgkin's lymphomas. *Blood.* 1998; 91:747-55.

LIMITACIONES DE RESPONSABILIDAD

* Ventana®, ultraView™, iVIEW™ y BenchMark® son marcas comerciales registradas propiedad de Ventana Medical Systems, Inc. Los anticuerpos de Cell Marque han sido desarrollados, fabricados y distribuidos por Cell Marque Corporation y su venta a través de Ventana Medical Systems, Inc. (miembro del Roche Group) no implica la aprobación, el respaldo ni cualquier garantía de calidad o rendimiento de dichos anticuerpos de Cell Marque por parte de Ventana Medical Systems, Inc.

 www.cellmarque.com

 EC REP EMERGO EUROPE
Molenstraat 15, 2513 BH, The Hague, NL



Anticuerpo anti- MALT1



MALT1 validation file

Target: MALT1 (Mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1)

Clone name: RON169A

Description: mouse monoclonal

Antigen used: pCDNA3-MALT1-flag plasmid vector

Isotype: IgG1

Antigen species: human

Localization: cytoplasm

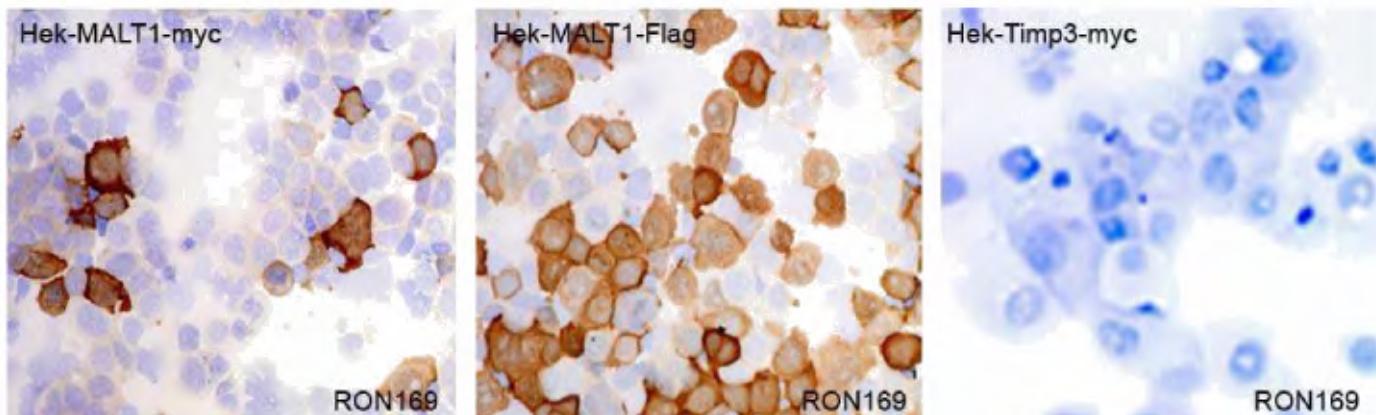
Positive control: SSK41 cell line

Storage Buffer: Preservative: Sodium Azide. Constituents: Tissue culture supernatant

Storage: Aliquot and store at 4C. Do not freeze

Characterization

To confirm that RON169A mAb recognized human MALT1 protein, immunohistochemistry on frozen cytocentrifuge preparations of human MALT1 expressed in HEK293T was performed. Cytospin preparation of myc tagged human Timp3 protein was used as a negative control.





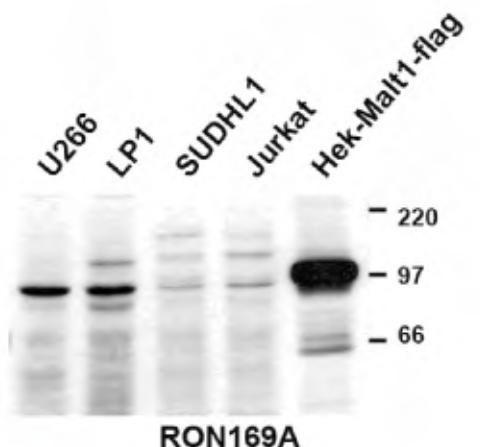
MALT1 validation file

Applications

- WB- Western Blotting: RON169A mAb is able to detect MALT1 protein by WB.

Dilution: neat supernatant

	Recommended
	Inconclusive
	Not recommended
	Not tested



Predicted molecular weight: **90kDa**
Observed molecular weight: **90kDa**

Lanes

Lane 1	U266 cell line	(100ug) (+)
Lane 2	LP1 cell line	(100ug) (+)
Lane 3	SUDHL1 cell line	(100ug) (+)
Lane 4	Jurkat cell line	(100ug) (+)
Lane 5	Hek-Malt1-flag	(100ug) (+)

- IHC-F-Immunohistochemistry (frozen): not working
- IHC-P-Immunohistochemistry (paraffin): not working
- IF-Immunofluorescence: not working
- FC-Flow cytometry: Not done

Publications

Maestre L, Fontan L, Martinez-Climent JA, Garcia JF, Cigudosa JC, Roncador G. Generation of a new monoclonal antibody against MALT1 by genetic immunization. Hybridoma (Larchmt). 2007 Apr; 26 (2):86-91.

Anticuerpo anti- PRDM1/BLIMP-1



PRDM1/BLIMP1 validation file (Lot A12)

Target: Human PRDM1/BLIMP1 alpha and beta isoforms

Protein predicted molecular weight: 95 kDa (alpha isoform) and 77 kDa (beta isoform)

Clone name: ROS195G **Description:** Mouse monoclonal

Antigen used: GST-PRDM1 (full length protein)

Isotype: IgG1

Antigen Species: Human and mouse

Localization: Nuclear

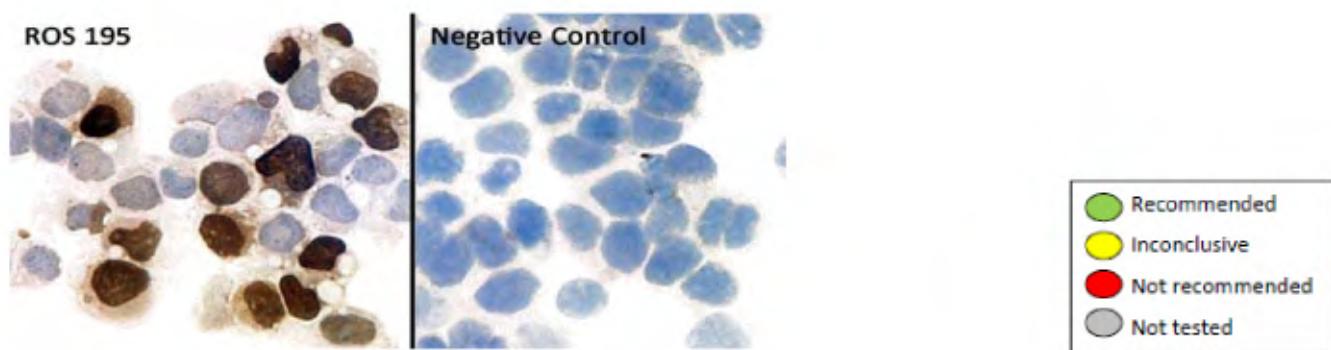
Positive control: Tonsil

Storage Buffer: Preservative: Sodium Azide. Constituents: Tissue culture supernatant

Storage: Aliquot and store at 4C. Do not freeze

Characterization

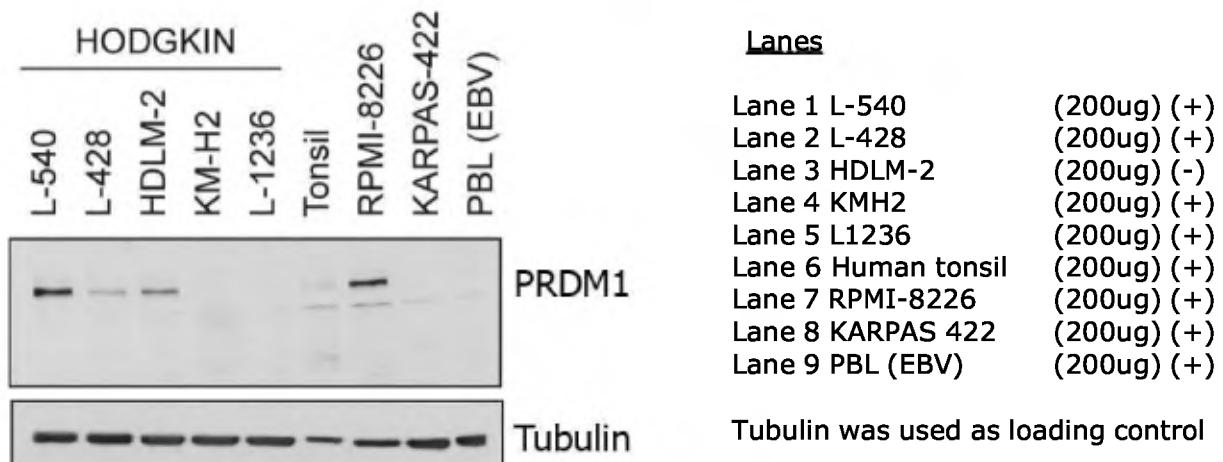
Immunohistochemistry on frozen cytocentrifuge preparations of Flag-tagged human PRDM1 expressed in Hek293T.



Applications

WB- Western Blotting: Mouse monoclonal ROS195 can be used to detect PRDM1 alpha and beta protein in human tissues and cell lines.

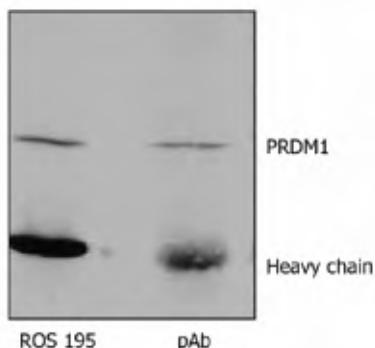
Dilution: Mouse antibody ROS195 was used as undiluted supernatant.



PRDM1/BLIMP1 validation file (Lot A12)

- **IP- Immunoprecipitation:** Immunoprecipitation of protein extracts from normal human tonsil with ROS195 antibody and a specific polyclonal antibody (kindly provided by Dr. Mark M. Davis, USA) followed by WB with ROS195 antibody.

Dilution: Mouse antibody ROS195 was used as undiluted supernatant (40ul/lane) and anti-PRDM1 polyclonal was used 1:150.



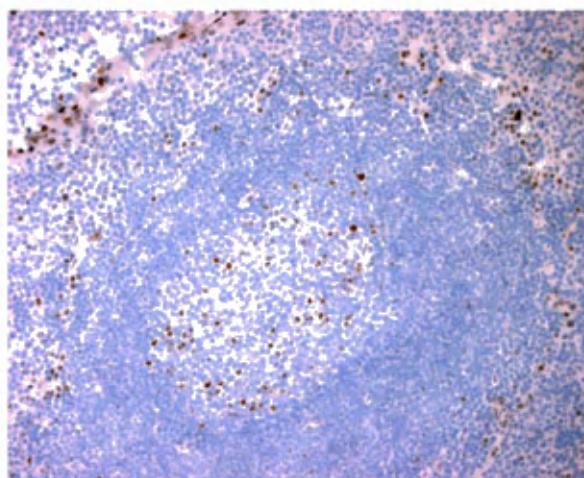
Results:

Immunoprecipitation of protein extracts from normal tonsil with the anti anti-PRDM1 ROS195 antibody and with one anti-PRDM1 polyclonal followed by western blotting with the ROS195 antibody (neat). In both cases it is possible to observe a specific band of 95 kDa confirming antibody specificity.

- **IHC-F-Immunohistochemistry (frozen):** Mouse monoclonal ROS195 can be used to detect PRDM1 expression in human frozen tissue.

Tissue sample: Human tonsil

Dilution: neat



PRDM1/BLIMP1 validation file (Lot A12)

IHC-P-Immunohistochemistry (paraffin): Mouse monoclonal ROS195 can be used to detect PRDM1 expression in paraffin human tissues.

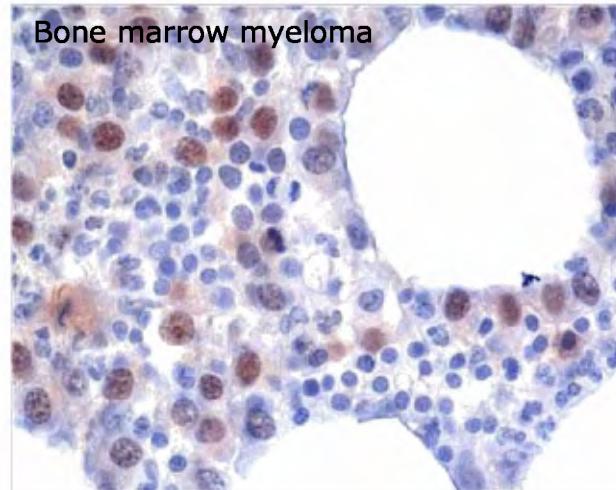
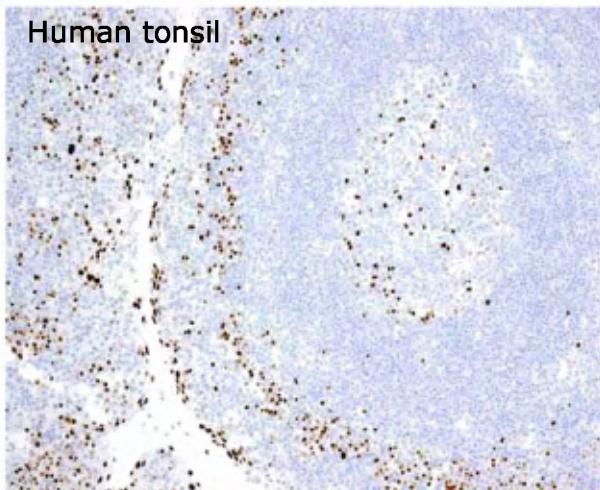
Tissue sample: Human tonsil and bone marrow myeloma.

Dilution: 1:10

Antigen retrieval: Tris-EDTA (20 min)

Detection kit used: Novolink.

Machine used: BondMax machine (Leica).

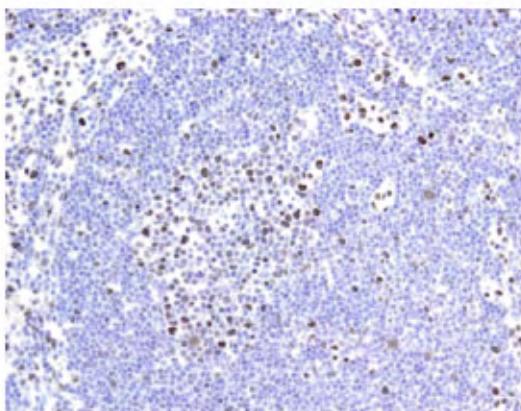


IHC-P-MOUSE Immunohistochemistry (paraffin): Mouse monoclonal ROS195 can be used to detect Blimp-1 expression in paraffin **mouse** tissue.

Tissue sample: mouse lymph node

Dilution: Neat supernatant

Method used: Discovery XT (Ventana) CC1 OmniMap.



PRDM1/BLIMP1 validation file (Lot A12)



IF -Immunofluorescence: Not working.



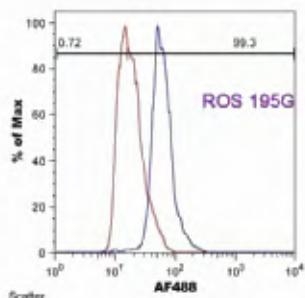
FC-Flow cytometry: Mouse monoclonal ROS195 can be used to detect Blimp-1 expression by Flow Cytometry.

Samples: human lymphoid cell lines (MOLT4 and OPM2)

Dilution: 50ul ROS195 supernatant/one million cells/tube

RED: Negative cell line MOLT4 (T cell leukemia)

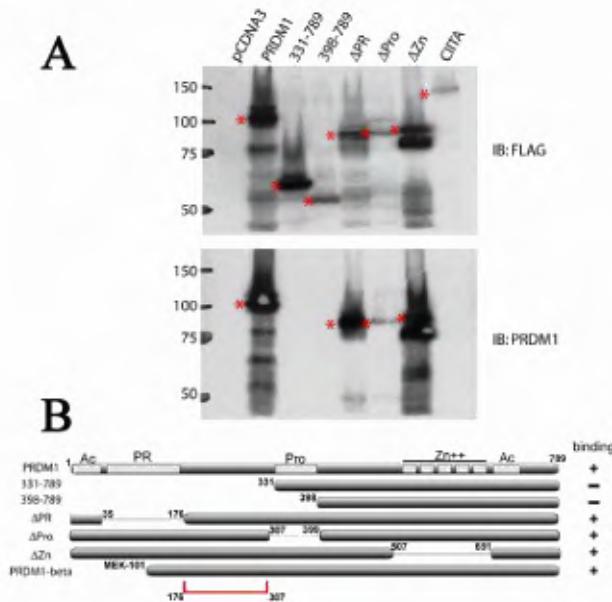
BLUE: Positive cell line OPM2 (multiple myeloma)



Additional information

Epitope recognized by ROS195 mAb

ROS195 monoclonal antibody recognize site between amino acids 176 and 307 and is recognizing the two PRDM1/Blimp-1 isoforms. Work done by Dr K. Wright (Lee Moffitt Cancer Center)



Publications

Garcia JF, Roncador G, Garcia JF, Sanz AI, Maestre L, Lucas E, Montes-Moreno S, Fernandez Victoria R, Martinez-Torrecuadrada JL, Marafioti T, Mason DY, Piris MA. PRDM1/BLIMP-1 expression in multiple B and T-cell lymphoma. Haematologica. 2006. Apr; 91(4):467-74.

Purified anti-Blimp-1 Antibody

Catalog# / Size 648202 / 100 µg

Clone ROS195G (See other available formats)

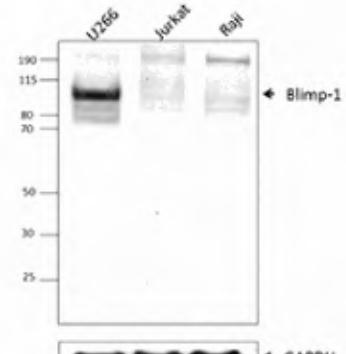
Other Names B lymphocyte-induced maturation protein-1, PRDM-1, BLIMP1

Isotype Mouse IgG1

Ave. Rating ★★★★☆ 0 reviews

Description

Blimp-1 is a 98 Kd protein containing five Kruppel-type zinc finger domains that confer sequence specific DNA binding. It has been postulated to be a master regulator of terminal B cell differentiation. In the BCL-1 lymphoma model of differentiation from mature B cells to plasma cells, ectopic expression of Blimp-1 is sufficient to cause terminal differentiation manifested by loss of surface immunoglobulin, IgM secretion, expression of syndecan-1 and cessation of cell division. Recently, it is reported that Blimp-1 is also involved in T cell differentiation and T cell homeostasis and suppression of IL-2 production.



Total cell lysates (15 µg protein) from U266, Jurkat and Raji were resolved by 4-12% Bis-tris gel electrophoresis, transferred to nitrocellulose, and probed with anti-Blimp-1 (clone ROS195G). Proteins were visualized using a goat anti-mouse IgG secondary antibody conjugated to HRP and chemiluminescence detection. Purified anti-GAPDH antibody was used as a loading control.

Reactivity Human, Cross-Reactivity: Mouse

Immunogen Recombinant GST-blimp-1 protein

Formulation Phosphate-buffered solution, pH 7.2, containing 0.09% sodium azide.

Preparation The antibody was purified by affinity chromatography.

Concentration 0.5 mg/ml

Storage & Handling The antibody solution should be stored undiluted between 2°C and 8°C.

Application WB - Quality tested
IHC, IP, IF, ELISA - Reported in the literature

Recommended Usage Each lot of this antibody is quality control tested by Western blotting. For Western blotting, the suggested use of this reagent is 5 µg per ml. It is recommended that the reagent be titrated for optimal performance for each application.

Application References 1. Garcia JF, et al. 2006. *Haematologica* 91:467.

2. Travert M, et al. 2012. *Blood*. 119:5795. PubMed

3. Tsao HW, et al. 2013. *PNAS*. 110:15776. PubMed

[Publication Library](#)

Antigen Details

Structure 98 Kd protein containing five Kruppel-type zinc finger domains

Distribution Expressed in CD4+ and CD8+ effector/memory T cells and in Foxp3+ T reg cells. In the B cell lineage, it is specifically expressed in the antibody secreting cells.

Function A transcription repressor expressed in B and T cells.

Antigen References 1. Zhao WL, et al. 2008. *Blood* 111:3867.
2. Climmino L, et al. 2008. *J. Immunol.* 181:2338.
3. Martins G and Calame K. 2008. *Annu Rev Immunol.* 26:133.

Gene ID 639

UniProt View information about Blimp-1 on UniProt.org

Documentation

[Technical data sheet](#)

 [Certificate of Analysis](#)

 [Safety Data Sheet](#)

Related Protocols

[Western Blotting Protocol](#)

Related FAQs

There are no FAQs for this product.

Related Categories

[Immunology > Human Immunology > B Cells > Blimp-1 >](#)

[Immunology > Mouse Immunology > B Cells > Blimp-1 >](#)

For research use only. Not for diagnostic use. Not for resale. BioLegend will not be held responsible for patent infringement or other violations that may occur with the use of our products.

*These products may be covered by one or more Limited Use Label Licenses (see the BioLegend Catalog or our website, www.biolegend.com/ordering#license). BioLegend products may not be transferred to third parties, resold, modified for resale, or used to manufacture commercial products, reverse engineer functionally similar materials, or to provide a service to third parties without written approval of BioLegend. By use of these products you accept the terms and conditions of all applicable Limited Use Label Licenses. Unless otherwise indicated, these products are for research use only and are not intended for human or animal diagnostic, therapeutic or commercial use.

BioLegend Inc., 9727 Pacific Heights Blvd, San Diego, CA 92121 www.biolegend.com
Toll-Free Phone: 1-877-Bio-Legend (246-5343) Phone: (858) 768-5800 Fax: (877) 455-9587



PRDM1 / BLIMP1 antibody (mAb)

Catalog No: 61167, 61168

Clone: ROS195

Isotype: IgG1

Application(s): IHC, WB

Reactivity: Human

Purification: Protein G Chromatography

Host: Mouse

Concentration: 1 µg/µl

Quantity: 100 µg, 10 µg

Molecular Weight: 77 & 95 kDa

Background: PRDM1 / BLIMP1 is a transcriptional repressor that binds to specific target sites in DNA and recruits co-repressors. PRDM1 / BLIMP1 is a master regulator for B cell terminal differentiation, is essential for normal development and immunity and a putative tumor suppressor in diffuse large B cell lymphomas (DLBCLs). PRDM1 / BLIMP1 specifies primordial germ cells through the silencing of the default somatic pathway. PRDM1 / BLIMP1 also acts as a master regulator of intestinal maturation.

Immunogen: This PRDM1 / BLIMP1 antibody was raised against full-length recombinant human PRDM1 / BLIMP1 protein.

Buffer: Purified IgG in PBS with 30% glycerol and 0.035% sodium azide. Sodium azide is highly toxic.

Application Notes:

Published Applications:

IHC

WB

See references for experimental details. Individual optimization may be required.

References: PRDM1 / BLIMP1 antibody has been cited in one or more publications. To see an up-to-date listing of papers that describe its use, please go to www.activemotif.com/catalog/details/61167.

Storage and Guarantee: Antibodies in solution can be stored at -20°C for 2 years. Avoid repeated freeze/thaw cycles and keep on ice when not in storage. This product is guaranteed for 6 months from date of receipt.

This product is for research use only and is not for use in diagnostic procedures.

ANEXO 2. PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS Y PUBLICACIONES CIENTÍFICAS RELACIONADAS

Los resultados de los trabajos que constituyen la base de la presente Tesis Doctoral han permitido la participación en otras publicaciones científicas y en los congresos internacionales que se relacionan a continuación:

Participación en publicaciones científicas relacionadas

Nie K, Gomez M, Landgraf P, **Garcia JF**, Liu Y, Tan LH, Chadburn A, Tuschl T, Knowles DM, Tam W. “*MicroRNA-mediated down-regulation of PRDM1/Blimp-1 in Hodgkin/Reed-Sternberg cells: a potential pathogenetic lesion in Hodgkin lymphomas*”. Am J Pathol. 2008 Jul;173(1):242-52.

Zhao WL, Liu YY, Zhang QL, Wang L, Leboeuf C, Zhang YW, Ma J, **Garcia JF**, Song YP, Li JM, Shen ZX, Chen Z, Janin A, Chen SJ. “*PRDM1 is involved in chemoresistance of T-cell lymphoma and down-regulated by the proteasome inhibitor*”. Blood. 2008 Apr 1;111(7):3867-71. Epub 2008 Jan 30.

Liu YY, Leboeuf C, Shi JY, Li JM, Wang L, Shen Y, **Garcia JF**, Shen ZX, Chen Z, Janin A, Chen SJ, Zhao WL. “*Rituximab plus CHOP (R-CHOP) overcomes PRDM1-associated resistance to chemotherapy in patients with diffuse large B-cell lymphoma*”. Blood. 2007 Jul 1;110(1):339-44. Epub 2007 Mar 22.

Bates GJ, Fox SB, Han C, Leek RD, **Garcia JF**, Harris AL, Banham AH. “*Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse*”. J Clin Oncol. 2006 Dec 1;24(34):5373-80.

Participación en congresos internacionales relacionados

García Verdes-Montenegro JF, García JF, Sanchez-Verde L, Maestre- L, Lucas E, Romero S, Piris M.A. y Roncador G. “*Genetic Immunization: A New Monoclonal Antibody For Detection Of Bcl-6 Protein On Paraffin Sections*”. Tipo de participación: póster. Congreso: XII Meeting of the European Association for Haematopathology. Lugar de celebración: Thessaloniki, Grecia. Fecha: 26 Septiembre – 1 Octubre, 2004.

Gaynor J. Bates, Stephen B. Fox, Cheng Han, Russell D. Leek, **José F. Garcia**, Adrian L. Harris and Alison H. Banham. “*Increased regulatory T-cell numbers distinguish high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse*”. Tipo de participación: póster. Congreso: 5th European Breast Cancer Conference. Lugar de celebración: Nice, Francia. Fecha: 21-25 Marzo, 2006.

Kui Nie, Mario F Gomez, Pablo Landorf, **Jose-Francisco Garcia**, Yifang Liu, Leonard HC Tan, Amy Chadburn, Thomas Tuschl, Daniel M. Knowles, Wayne Tam. “*MicroRNA-mediated Translation Repression of PRDM1 in Hodgkin/Reed-Sternberg Cells – a Potential Pathogenetic Lesion in Hodgkin Lymphoma*”. Tipo de participación: póster. Congreso: The American Society of Hematology, 48th Annual Meeting and Exposition. Lugar de celebración: Orlando, Florida. Fecha: 9-12 Diciembre, 2006.

K Nie, MF Gomez, P Landgraf, **JF Garcia**, A Chadburn, YF Liu, LHC Tan, T Tuschl, DM Knowles, W Tam. “*Downregulation of the Tumor Suppressor Gene PRDM1/Blimp-1 by Putative Oncogenic MicroRNAs in Hodgkin/Reed-Sternberg Cells*”. Tipo de participación: póster. Congreso: United States and Canadian Academy of Pathology, Annual meeting. Fecha: 24-30 Marzo, 2007.

