

**VNiVERSIDAD D SALAMANCA**

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA**

**HEMATOLOGÍA**



**TESIS DOCTORAL**

**ESTUDIO DEL GENOMA Y DEL TRANSCRIPTOMA EN LAS  
DISTINTAS FASES EVOLUTIVAS DE LAS GAMMAPATÍAS  
MONOCLONALES**

**Lucía López Corral**

**2012**



D. Jesús San Miguel Izquierdo, Catedrático de Hematología de la Facultad de Medicina  
y Jefe del Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca,

y

D<sup>a</sup>. Norma C. Gutiérrez Gutiérrez, Doctor en Medicina, Médico Adjunto de  
Hematología del Hospital Universitario de Salamanca.

**CERTIFICAN:**

Que el trabajo realizado bajo nuestra dirección por D<sup>a</sup>. Lucía López Corral, titulado  
“ESTUDIO DEL GENOMA Y DEL TRANSCRIPTOMA EN LAS DISTINTAS FASES EVOLUTIVAS  
DE LAS GAMMAPATÍAS MONOCLONALES”, reúne las condiciones de originalidad  
requeridas para optar al grado de Doctor en Medicina.

Y para que así conste, firmamos la siguiente certificación en Salamanca, a doce de  
abril de dos mil once.

Prof. Jesús F. San Miguel Izquierdo

Dra. Norma C. Gutiérrez



## **Agradecimientos**



*A Jesús y a Norma, excelentes maestros y mejores personas.  
Espero llevarme conmigo parte de su infinita capacidad de trabajo e inmensa ilusión  
por el mismo.*

*A todo el Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca,  
incluyendo el personal de los laboratorios y muy especialmente el de Citogenética, por  
su unidad como equipo, por el apoyo de cada uno de sus integrantes, porque siempre  
han prestado colaboración incondicional cuando la he solicitado; porque cada día me  
confirman que el integrarme en dicho equipo ha sido una de mis mejores elecciones.*

*A los hematólogos de otros hospitales que tan amablemente me han enviado las  
muestras de sus pacientes incluidos en este trabajo.*

*A los pacientes, porque a ellos va dirigido nuestro trabajo y finalmente son  
quienes tienen que juzgarlo.*





**"Aprende lo que desconoces, no vengas a ser inútil doctor; sé primero alumno, después doctor; consigue el nombre de maestro cultivando las disciplinas; el bien que oyes, apréndelo; el bien que aprendieres, enséñalo; no abandones el esfuerzo de aprender y de enseñar. La ciencia que por el oído percibes derrámala por la boca.**

**Agranda en ti aún más la sabiduría compartiéndola con otros; sea tanto más abundante la doctrina, cuanto más participada. La sabiduría se engrandece esparciéndola, disminuye reservándose; la ciencia se hace más patente al darse y cuanto más se extiende más abunda".**

***Magníficos consejos de San Isidoro de Sevilla (c. 560 - 636).***

***De Sinonimorum, lib. II.***



## **Índice**



**I. INTRODUCCIÓN****1. Concepto y clasificación de las gammopatías monoclonales**

1.1 Mieloma múltiple.....	9
1.2 Criterios diagnósticos de las gammopatías monoclonales.....	9
1.2 Historia natural del mieloma múltiple: GMSI y mieloma múltiple quiescente.....	11
1.2.1 Modelos predictivos de progresión de GMSI y mieloma múltiple quiescente a mieloma múltiple sintomático.....	12
1.2.2 Tratamiento de las gammopatías monoclonales premalignas.....	13

**2. Biología de la célula tumoral de las gammopatías monoclonales**

2.1 Origen de la célula mielomatosa.....	16
2.2 Alteraciones cromosómicas de la célula mielomatosa.....	17
2.3. Alteraciones genómicas detectadas por tecnologías de alto rendimiento...24	
2.3.1 Arrays de SNPs .....	25
2.3.2 Microarrays.....	28
2.3.3. Secuenciación masiva.....	39
2.3.4. Micro-RNAs.....	39
2.3.4. Metilación y cambios epigenéticos.....	40

**3. Aspectos genéticos de las fases evolutivas de las gammopatías monoclonales**

3.1 Naturaleza multifásica del cáncer.....	41
3.2 Modelo patogénico del mieloma múltiple en etapas.....	44

**4. Referencias de la introducción****II. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS**

1. Hipótesis de trabajo e innovaciones.....	63
2. Objetivos.....	65

**III. MATERIAL Y MÉTODOS**

1. Pacientes y muestras.....	69
2. Metodología.....	69
2.1 Purificación de células plasmáticas.....	69

2.2 Hibridación in situ fluorescente.....	71
2.3 Extracción de ácidos nucleicos.....	73
2.4 Hibridación del DNA en el array de SNPs.....	76
2.5 Hibridación del RNA en el array de expresión.....	82
2.6 Otros métodos: citometría de flujo.....	89
2.7 Análisis estadístico de los resultados.....	90
<b>3. Referencias de Material y Métodos</b>	
<b>IV. RESULTADOS</b>	
<b>1. Esquema del apartado de resultados.....</b>	<b>95</b>
<b>2. Etiopatogenia de la transformación en etapas del Mieloma Múltiple.....</b>	<b>96</b>
2.1 Capítulo 1: Estudios de hibridación “in situ” fluorescente: La progresión de GMSI a MM quiescente y finalmente a MM sintomático conlleva una expansión clonal de las células plasmáticas genéticamente anormales.....	96
2.2 Capítulo 2: Estudios de SNP-arrays: Análisis de SNP-arrays revelan gran complejidad genómica en las gammapatías monoclonales: de la GMSI al MM.....	119
2.3 Capítulo 3: Estudios de expresión génica mediante microarrays: Análisis del perfil de expresión génica en las gammapatías monoclonales: de la GMSI al MM pasando por el MMQ.....	159
<b>3. Biología del Mieloma Múltiple Quiescente de Alto Riesgo.....</b>	<b>173</b>
3.1 Capítulo 4: Estudio de la fracción medular tumoral: Análisis genómico del Mieloma Múltiple Quiescente de alto riesgo.....	173
3.2 Capítulo 5: Estudio de la fracción medular no tumoral: El análisis de perfil de expresión génica de las células hematopoyéticas no tumorales de la medula ósea de los pacientes con Mieloma Múltiple Quiescente de alto riesgo no se ve modificado por el tratamiento con Lenalidomida/Dexametasona.....	189
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>201</b>
<b>1. Discusión general.....</b>	<b>203</b>
<b>2. Referencias de la discusión.....</b>	<b>208</b>

<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>211</b>
<b>VII. MATERIAL DERIVADO DE LOS TRABAJOS.....</b>	<b>213</b>
<b>VIII. FINANCIACIÓN RECIBIDA PARA LOS TRABAJOS.....</b>	<b>219</b>
<b>IX. ABREVIATURAS.....</b>	<b>223</b>





## **Introducción**



## **1. CONCEPTO Y CLASIFICACIÓN DE LAS GAMMAPATÍAS MONOCLONALES**

### **1.1 Mieloma Múltiple**

Las gammapatías monoclonales constituyen un grupo de trastornos caracterizados por la proliferación clonal de células plasmáticas (CP) que producen una inmunoglobulina (Ig) de carácter monoclonal, componente monoclonal (CM) o paraproteína, que se detecta en suero y/u orina.

El mieloma múltiple (MM) es el paradigma de gammapatía monoclonal. Es una hemopatía maligna caracterizada por una acumulación incontrolada de células plasmáticas (CP) clonales en la médula ósea (MO), que generalmente se asocia con la producción de CM, y ocasiona daño de órganos. Representa el 1% de todas las neoplasias y aproximadamente el 10% de las hemopatías malignas. Su incidencia es de 4-5 casos por cada 100.000 habitantes/año y la edad media de aparición se sitúa en torno a 65 años<sup>1</sup>. Hasta hace poco tiempo la mediana de supervivencia de los pacientes con MM no superaba los 3 años, si bien el pronóstico ha variado sustancialmente con la introducción de los nuevos fármacos en los últimos años, de forma que cada vez hay más series que superan los 5 años de mediana de supervivencia<sup>2-4</sup>. Esto se debe atribuir fundamentalmente a la utilización de 3 nuevos fármacos con alta eficacia en esta enfermedad: talidomida, lenalidomida y bortezomib. No obstante, los avances en el tratamiento de soporte también han contribuido a mejorar la supervivencia y la calidad de vida de los pacientes gracias a una mejora en la indicación de la diálisis, al empleo de bifosfonatos y de estimulantes del receptor de la eritropoyetina y al uso de nuevos abordajes quirúrgicos como la vertebroplastia y la cifoplastia.

### **1.2 Criterios diagnósticos de las gammapatías monoclonales**

Aunque el diagnóstico del MM es generalmente sencillo, no es raro encontrar casos en el límite difuso que hay entre el MM y otras gammapatías monoclonales. De hecho, ha habido hasta 3 propuestas de criterios diagnósticos -Southwest Oncology Group (SWOG), British Columbia Cancer Agency (BCCA) y Chronic-Leukemia-Myeloma Task Force-, dando lugar a la paradoja de que un paciente podía tener dos diagnósticos

diferentes dependiendo de qué sistema diagnóstico se utilizara. Este problema quedó aparentemente resuelto en el año 2003, cuando el Grupo Internacional del Mieloma (IMWG) publicó los criterios diagnósticos<sup>5</sup>, criterios que han sido posteriormente actualizados en 2010<sup>6</sup>.

	GMSI	MM Quiescente	MM Sintomático
CM.....	< 3 g/dL Y	≥3 g/dL Y/O	SI Y
CP en MO (%).....	< 10% Y	≥ 10% Y	> 10% <sup>b</sup> Y
Daño Órganos <sup>a</sup> .....	<b>NO</b>	<b>NO</b>	SI

a) Myeloma Related Organ or Tissue Impairment (end organ damage) related to Plasma cell proliferative process: anemia with 2 g/dL below the normal level or <10 g/dL, or serum calcium level >10 mg/L (0.25 mmol/L) above normal or >110 mg/dL (2.75 mmol/L), or lytic bone lesions or osteoporosis with compressive fractures, or renal insufficiency (creatinine >2 mg/dL or 173 μmol/L), [CRAB: Calcium increase, Renal impairment, Anemia and Bone lesion] or symptomatic hyperviscosity, amyloidosis or recurrent bacterial infections (>2 episodes in 12 m).

b) For symptomatic multiple myeloma, a minimum level of M-component or BM plasma cell infiltration (although usually it is >10%, is not required, provided than this two features coexists with the presence of end organ damage).

**Figura 1:** Criterios diagnósticos de las gammapatías monoclonales. International Working Group (BJH 2003; 121:749)

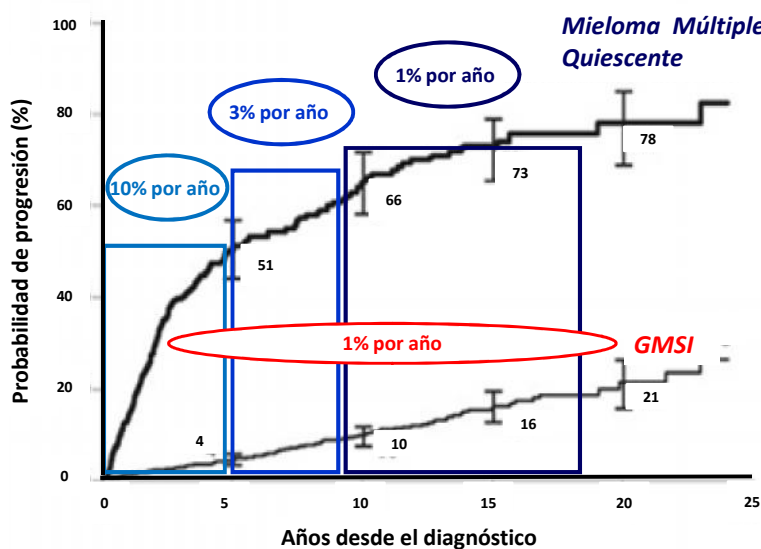
Lo más novedoso es que el diagnóstico de un MM sintomático requiere la demostración de una lesión orgánica o tisular relacionada con la neoplasia proliferante. 3% Esta lesión orgánica se define por la presencia de al menos una de siete manifestaciones posibles: a) anemia, con reducción de la hemoglobina (Hb) de al menos 2 g/dL respecto al valor normal o valor de Hb inferior a 10 g/dL; b) hipercalcemia mayor de 10 mg/L (0,25 μmol/L) por encima de lo normal o cifra absoluta de calcemia superior a 110 mg/dL (2,75 μmol/L); c) lesiones osteolíticas u osteoporosis con fracturas compresivas no atribuibles a otra causa; d) insuficiencia renal, con creatinina superior a 2 mg/dL o a 173 μmol/L e) hiperviscosidad sintomática; f) amiloidosis primaria (AL) y g) infecciones bacterianas recurrentes (más de 2 episodios graves con ingreso hospitalario en 12 meses). En la última clasificación,

discutida recientemente en el Workshop del MM en París (Mayo 2011), se ha eliminado el citado criterio de las infecciones.

### **1.3 Historia natural del mieloma múltiple: gammapatía monoclonal de significado incierto y mieloma múltiple quiescente**

Hasta hace poco se pensaba que un tercio de los MM de nuevo diagnóstico habían padecido previamente una GMSI, si bien actualmente varios análisis epidemiológicos han demostrado que la práctica totalidad de los mismos tienen como antecedente una GMSI. En este sentido, dos estudios independientes han constatado que la mayoría de casos de MM están precedidos por una GMSI<sup>7,8</sup>.

La GMSI es la gammapatía monoclonal más frecuente, y constituye aproximadamente el 50-60% de las mismas<sup>9</sup>. Se trata de una entidad premaligna, en la que el sujeto presenta una infiltración baja de CP en la MO (inferior a 10%) con un CM inferior a 3g/dL y que no produce daño de órganos, de forma que el paciente se encuentra asintomático<sup>5</sup>. En una situación intermedia entre la GMSI y el MM sintomático se encuentra el MM “*smoldering*”, quiescente o asintomático (MMQ), que cumple todos los criterios diagnósticos de un MM, a excepción de los síntomas<sup>5,5</sup>. En este sentido, tanto la GMSI como el MMQ son entidades premalignas y asintomáticas por definición, con capacidad de evolución a MM sintomático. La importancia clínica de establecer diferencias entre estas dos enfermedades es que ambas difieren de forma significativa en la tasa de progresión a MM sintomático o entidades relacionadas, ya que esta es aproximadamente de un 1% al año en la GMSI, mientras que la probabilidad acumulada de progresión en el MMQ es de hasta un 10% en los primeros 5 años<sup>9,10</sup>. Otra diferencia entre GMSI y MMQ es que la tasa de progresión en la GMSI se mantiene constante en el tiempo, mientras que el riesgo de transformación del MMQ disminuye conforme pasan los años desde el diagnóstico, con tasas del 3% al año en los siguientes 5 años y del 1% al año posteriormente<sup>10</sup>.



**Figura 2:** Riesgo de progresión de la GMSI y el MM quiescente. Adaptado de Kyle et al, New England 2007.

### 1.3.1 Modelos predictivos de progresión de GMSI y MMQ a MM sintomático

Actualmente carecemos de marcadores biológicos fiables que nos permitan predecir qué pacientes con GMSI y MMQ progresarán a MM sintomático, y cuáles no lo harán.

Basado en los marcadores clínicos disponibles, tanto el grupo de la Clínica Mayo como el Grupo Español (PETHEMA/GEM) han establecido modelos de estratificación del riesgo para estas entidades premalignas. El modelo de la Clínica Mayo enfatiza el crecimiento de la masa tumoral medido a través del CM y de las cadenas ligeras libres (FLC)<sup>11,12</sup>. El modelo del Grupo Español se caracteriza fundamentalmente por utilizar la citometría de flujo (CMF) multiparamétrica para identificar las CP aberrantes<sup>13</sup>.

El modelo de la Clínica Mayo establece para la GMSI tres factores de riesgo fundamentales: GMSI no IgG, CM > 1.5 mg/dL y cociente de FLC alterado (rango normal: 0,26-1,65). A los 20 años, el riesgo absoluto de progresión para pacientes con GMSI y ninguno, uno, dos o tres factores de riesgo es de 5%, 21%, 37% y 58%, respectivamente<sup>12</sup>.

Para el MMQ, los factores de riesgo de progresión que incluye el modelo de la Clínica Mayo son CP en la MO >10%, CM en suero >3 g/dL y cociente de FLC alterado (rango normal: 0,125-8). El riesgo acumulado de progresión a 10 años para pacientes con MMQ y uno, dos o tres factores de riesgo es de 50%, 65% y 84%, respectivamente<sup>11</sup>.

En el modelo del Grupo Español la identificación de la población de CP aberrantes (CPa) mediante CMF multiparamétrica es fundamental para predecir el riesgo de transformación tanto de tanto la GMSI como el MMQ a MM sintomático<sup>13</sup>. Las CP normales son positivas para CD138 y expresan con gran intensidad CD38. Las CP aberrantes (CPa) expresan CD38 débil, CD56+, CD19- y/o CD45-. En un trabajo que incluyó 407 pacientes con GMSI, Pérez-Persona *et al* establecieron que el porcentaje de CPa dentro del compartimento de CP (CPa / CPMO) > 95% se asociaba con un mayor riesgo de progresión ( $P < 0.001$ )<sup>13</sup>. De esta forma, y de acuerdo al Grupo Español, los factores de riesgo de progresión de las GMSI son CPa/CPMO > 95% y la aneuploidía. La supervivencia libre de progresión (SLP) a 5 años para pacientes con GMSI y ninguno, uno, dos o tres factores de riesgo es de 2%, 10% y 46% ( $P < 0.001$ ), respectivamente<sup>13</sup>.

Los factores de riesgo de progresión que incluye este último modelo para los pacientes con MMQ son CPa/CPMO > 95% e inmunoparesis (descenso de los niveles de las Igs policlonales)<sup>13</sup>. La SLP a 5 años para pacientes con MMQ y ninguno, uno o dos factores de riesgo es de 4%, 46% y 72%, respectivamente<sup>13</sup>.

Además de estos parámetros, Rosiñol *et al* definieron, tras estudiar una serie de 53 pacientes con MMQ, dos grupos de pacientes con comportamiento clínico y biológico diferente: el MMQ "evolving", caracterizado por un incremento progresivo del CM y una rápida progresión a MM sintomático, y el MMQ "no evolving", definido por estabilidad durante periodos largos de tiempo del CM hasta aumentar bruscamente previo progresión a MM sintomático (medianas de supervivencia desde el diagnóstico de 8,2 años en "evolving" vs 3,5 años en "no evolving")<sup>14</sup>.

### 1.3.2 Tratamiento de las gammopatías monoclonales premalignas

No existe indicación de tratamiento, en el momento actual y fuera de ensayo clínico para los pacientes con GMSI y MMQ<sup>15</sup>. El manejo de los mismos se reduce a un

seguimiento estrecho con el objetivo de detectar la progresión a MM sintomático, momento en que se hace preciso iniciar el tratamiento<sup>6</sup>. Si realizamos una analogía con lo que ocurre en otras neoplasias no hematológicas, como el cáncer de colon o de cérvix, en los cuales la base del tratamiento es la detección precoz de las formas premalignas y su erradicación, la actitud de “esperar y ver” resulta sorprendente. El fundamento de la misma se encuentra en dos ensayos prospectivos con agentes alquilantes, multicéntricos y aleatorizados, si bien con escaso número de pacientes, en los que no se encontraron diferencias significativas entre tratar o no tratar<sup>16,17</sup>. No obstante, y con los recientes conocimientos de la biología del MM, el paradigma futuro podría consistir en el tratamiento de aquellos subgrupos asintomáticos pero con alto riesgo de progresión, ya que podrían ser los pacientes que se beneficiaran de esta estrategia. Sin embargo, es obvio que en este contexto debe alcanzarse un balance positivo entre el beneficio clínico y el potencial tóxico de cualquier intervención terapéutica. Tras el fracaso de los agentes alquilantes, la utilización de nuevos fármacos tales como agentes inmunomoduladores, parece más atractiva debido a su perfil de toxicidad y eficacia. Asimismo, se han realizado otros intentos de tratamiento basados en la actuación sobre el micromediambiente medular, incluyendo la remodelación ósea.

Barlogie *et al* trataron 76 MMQ con pamidronato y talidomida, y encontraron que obtener una respuesta parcial se asociaba, sorprendentemente, con un menor tiempo hasta la necesidad de un tratamiento agresivo para el MM sintomático<sup>18</sup>. Otro estudio comparando ácido zoledrónico vs abstención demostró la reducción de eventos esqueléticos en la rama de tratamiento (55,5% vs 78,3%,  $P = 0.04$ ) pero sin encontrar diferencias en la mediana del tiempo hasta la progresión<sup>19</sup>. No obstante, en ninguno de estos estudios se separaron los MMQ de alto y bajo riesgo.

Nuestro grupo ha llevado a cabo un ensayo clínico fase III multicéntrico, en el que pacientes con MMQ de alto riesgo de progresión se aleatorizaron a recibir lenalidomida/dexametasona (LenDex) vs abstención. Los resultados preliminares muestran una ventaja tanto en el tiempo hasta la progresión como en la supervivencia global en el grupo de tratamiento<sup>20</sup>.

De forma similar, el ECOG/SWOG en Norte América está evaluando el tratamiento con lenalidomida vs abstención en pacientes con MMQ<sup>21</sup>. Además, el NCI en Bethesda



ha abierto recientemente un ensayo clínico con IPH2101, un anticuerpo monoclonal que bloquea los receptores KIR de las células NK, y por consiguiente aumenta la respuesta de las células NK contra las células mielomatosas (NCT01222286).

No obstante no debemos olvidar que estas estrategias terapéuticas no están exentas de efectos secundarios, los cuales constituyen el mayor temor en el momento actual puesto que se trata de administrar fármacos no inocuos a pacientes asintomáticos<sup>22</sup>. Por ejemplo, recientemente ha saltado una alarma, actualmente bajo investigación, sobre la mayor incidencia de neoplasias secundarias en el contexto del tratamiento prolongado con lenalidomida<sup>23</sup>. Así pues, es fundamental recalcar que, por el momento, ningún fármaco se encuentra aprobado ni puede ser recomendado fuera de ensayos clínicos para el tratamiento de estas entidades premalignas, si bien parece razonable pensar que, en un futuro muy cercano, esta actitud puede cambiar<sup>23</sup>.

## **2. BIOLOGÍA DE LA CÉLULA TUMORAL DE LAS GAMMAPATÍAS MONOCLONALES**

En los últimos años, la investigación de la biología del MM ha experimentado un progreso indiscutible que ha modificado sustancialmente los conceptos biológicos que teníamos de esta neoplasia hasta ahora. Por un lado, el desarrollo de las tecnologías genómicas ha permitido desentrañar nuevos mecanismos patogénicos. Por otro, el descubrimiento de interacciones estrechas entre el micromedioambiente de la MO y las CP han ayudado a entender algunos de los mecanismos de resistencia de la enfermedad, así como algunas de las manifestaciones clínicas de la misma. No obstante, a pesar de los avances en el conocimiento de la patogénesis del MM y de la generación de agentes farmacológicos dirigidos a funciones biológicas específicas, el MM sigue siendo una neoplasia incurable. De ahí que todos los esfuerzos destinados a comprender la génesis y desarrollo del MM puedan proporcionar pistas a la hora de descubrir y diseñar nuevos fármacos que consigan cambiar la historia natural del MM<sup>24</sup>.

Si bien el curso habitual de la mayoría de los MM pasa por una respuesta inicial al tratamiento seguida de posteriores recaídas cada vez más resistentes a los fármacos para finalizar en la muerte del paciente, la duración de este recorrido es muy variable

de unos pacientes a otros y puede ir desde 1 año a más de 20 años. Este curso clínico tan heterogéneo está indicando que el MM puede englobar diversas entidades definidas por alteraciones genómicas, particulares, por una diferente dependencia de la célula mielomatosa del contacto con el entorno medular o por trastornos biológicos aún desconocidos.

## 2.1 Origen de la célula mielomatosa

El momento en el que se produce la transformación neoplásica de la célula tumoral del MM continúa siendo objeto de controversia. La célula que predomina en la MO de los pacientes con MM es la CP, que constituye el último eslabón de la diferenciación linfocítica B. El proceso de diferenciación normal desde los primeros estadios de la célula B a la CP se caracteriza por tres mecanismos de remodelación del DNA que modifican los genes de las Igs: reordenamientos de los segmentos VDJ de las cadenas pesadas y ligeras de las Igs, mutaciones somáticas de las Igs y recombinación de los genes de las Igs que da lugar al cambio de isotipo de las cadenas pesadas de las Igs<sup>25-27</sup>. Los reordenamientos de los genes de las Igs de los precursores B que dan lugar a la formación del receptor de célula B (BCR) tienen lugar en la MO, mientras que el reconocimiento antigénico, la selección, las hipermutaciones somáticas y la recombinación genética se realizan en el centro germinal del ganglio linfático. En los síndromes linfoproliferativos existe un predominio de los tumores de centro germinal y post-centro germinal (80%), lo que podría explicarse por el hecho de que las células B del centro germinal se encuentran expuestas a los tres mecanismos de modificación del DNA que generan roturas de la doble hebra de DNA, mientras que las células B y T pre-germinales sólo están sometidas a los reordenamientos de los segmentos VDJ<sup>28,29</sup>. Tras la presentación antigénica, las células B “naive” pueden, o bien diferenciarse fuera del centro germinal hacia CP de “corta vida”, en las cuales los genes de las Igs no presentan hipermutación somática y que generalmente secretan IgM, o bien pueden entrar en el centro germinal y ser sometidas a la hipermutación somática y a la selección antigénica. Este último proceso genera la selección de células B capaces de producir anticuerpos con una alta afinidad por el antígeno. Estas células B IgM positivas que tienen mutación somática pueden pasar a la sangre como células B “de memoria”, o sufrir el proceso de recombinación de los genes de las Igs dando lugar al

cambio de isotipo de las cadenas pesadas a IgG, IgA, IgD o IgE, y posteriormente migrar a la MO donde interaccionarán con el estroma medular y se diferenciarán a CP de “larga vida”<sup>30</sup>. La secuenciación del gen de Ig VH ha mostrado que las células mielomatosas son células post-germinales con hipermutaciones somáticas pero sin variaciones intraclonales.

Por lo tanto, estos hallazgos sugieren que la célula clonogénica del MM es una célula post-germinal<sup>28</sup>, bien un linfocito B de memoria o un plasmablasto, que después de sufrir el proceso de mutación somática y de cambio de isotipo en los centros germinales, circula por la sangre periférica y finalmente emigra a la MO, donde bajo la influencia del micromedioambiente medular se produce su diferenciación a CP madura<sup>31</sup>. Así pues, teniendo en cuenta la información que han generado los estudios moleculares, se puede concluir que la célula clonogénica del MM es una célula B en los estadios finales de diferenciación B o bien, una célula más precoz en la que la transformación neoplásica no afectaría a los mecanismos normales de diferenciación que dan lugar a la CP de larga vida<sup>30,32,33</sup>.

## 2.2 Alteraciones cromosómicas de la célula mielomatosa

Las alteraciones genéticas del MM se han venido estudiando durante más de 25 años con un amplio abanico de técnicas que se han ido ampliando progresivamente a medida que se iban implantando en la comunidad científica. Todas ellas, desde la citogenética clásica pasando por la hibridación *in situ* fluorescente hasta llegar a la tecnología sofisticada de los microarrays y de la secuenciación masiva, han revelado un retrato cada vez más completo de la genética de la célula mielomatosa.

El estudio morfológico de los cromosomas mediante el cariotipo proporciona una visión global del genoma y permite detectar alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales. Sin embargo, entre sus principales limitaciones hay que destacar la dificultad en la obtención de metafases de las células neoplásicas y su baja resolución, que no permite la detección de alteraciones de tamaño inferior a 10 Mb<sup>34</sup>.

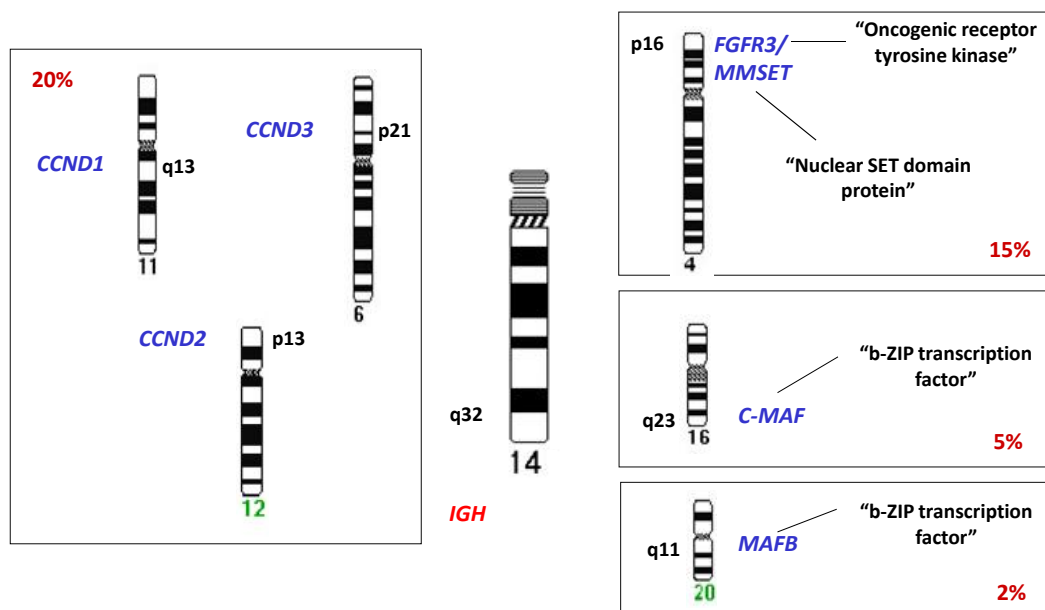
La información proporcionada por los estudios citogenéticos en el MM ha avanzado a menor ritmo que en otras neoplasias hematológicas, especialmente las leucemias agudas. Hay dos razones fundamentales que han motivado este hecho: 1) el bajo índice proliferativo de las CP que dificulta la obtención de metafases y que conlleva

una elevada proporción de cariotipos normales probablemente derivados de las células hematopoyéticas restantes y 2) la marcada complejidad de los cariotipos, de difícil interpretación, en los pocos casos en los que se consiguen metafases de las células mielomatosas<sup>35</sup>. De hecho, el porcentaje de casos anormales varía entre un 27% y un 46% en las series más amplias y casi siempre presentan una mezcla de metafases anormales y normales<sup>35-40</sup>. Generalmente los cariotipos anormales son complejos con múltiples cambios numéricos y estructurales que recuerdan a los vistos en los tumores sólidos.

La aparición de la HSF supuso una revolución a la hora de soslayar las dificultades encontradas al cariotipar las células mielomatosas. Las técnicas de HSF permiten visualizar fragmentos de DNA mediante su marcaje con fluorocromos y el posterior análisis en el microscopio de fluorescencia<sup>41</sup>. La ventaja de no necesitar mitosis para detectar alteraciones ha contribuido a identificar anomalías cromosómicas desconocidas. La mayor limitación de la HSF es que no abarca el genoma completo y se ciñe a alteraciones específicas para las que está diseñada la sonda. El desarrollo de aplicaciones de la HSF como la hibridación genómica comparada (HGC) y la hibridación *in situ* multicolor ha tratado de solventar este inconveniente.

La HGC es una técnica de citogenética molecular que permite realizar un análisis global de las ganancias y pérdidas de material genómico en una única hibridación sin necesidad de generar metafases<sup>42,43</sup>. Puesto que las alteraciones en el número de copias de DNA de determinadas regiones tienen una gran importancia en la patogenia del cáncer, la HGC ha despertado gran interés en el estudio de las neoplasias. El estudio del MM mediante HGC ha demostrado cambios genómicos en la inmensa mayoría de los MM (entre un 70-90%)<sup>44-48</sup>.

A diferencia de lo que sucede en las leucemias y en algunos linfomas, en el MM no se han encontrado anomalías cromosómicas específicas, aunque sí se han descrito un número importante de alteraciones cromosómicas recurrentes que pueden categorizarse en Tx de *IGH*, y ganancias y pérdidas cromosómicas. Se presenta una pequeña revisión de las alteraciones génicas más frecuentes descritas en el MM:



**Figura 3:** Translocaciones recurrentes del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (*IGH*)

### 2.2.1 Translocaciones del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (*IGH*):

Por un lado, la combinación de HISF y técnicas de biología molecular han demostrado una alta incidencia de translocaciones del gen de la cadena pesada de las Igs (*IGH*), localizado en la región 14q32, a diferentes regiones cromosómicas.

Si bien se han descrito numerosas regiones cromosómicas que se translocan al gen *IGH* {Kuehl, 2002 145 /id, aproximadamente en un 40% de los casos están implicadas una de las siguientes: 11q13 (*CCND1*)<sup>49</sup>, 4p16 (*FGFR3/MMSET*)<sup>49,50</sup>, 16q23 (*c-MAF*)<sup>51</sup>, 6p21 (*CCND3*)<sup>52</sup>, 20q11 (*MAFB*)<sup>53</sup> y 12p13 (*CCND2*). Aproximadamente el 20% de los MM tienen Tx de *IGH* que no involucran ninguna de estas regiones y que pueden afectar regiones cromosómicas diversas {Fonseca, 2004 137 /id; Bergsagel, 2005 146 /id}.

La prevalencia de la t(11;14) en el MM es del 15-20%. La t(11;14)(q13;q32) en la que el gen *CCND1* se yuxtapone al gen *IGH* dando lugar a un incremento en la expresión de la ciclina D1, es característica de los linfomas del manto. Sin embargo, los puntos de ruptura tanto en 11q13 como en 14q32 son completamente diferentes a los descritos en este tipo de linfoma<sup>54</sup>. En dicho linfoma, los puntos de ruptura de 11q13 se agrupan en la región llamada “major translocation cluster” (MTC) y el punto de ruptura de *IGH*

se localiza en la región JH<sup>54</sup>. Como resultado de esta translocación, *CCND1* se yuxtapone al potente enhancer 3' de IGH en el derivativo 14, lo que motiva un aumento de su expresión, como se ha observado en los estudios de expresión génica y de RT-PCR en los MM con t(11;14)<sup>55</sup>. Además, se ha encontrado una correlación entre la t(11;14) y los MM oligosecretores con morfología linfoplasmocitoide y expresión de CD20<sup>56</sup>. Aunque en un principio los resultados en cuanto a la repercusión de esta Tx en el pronóstico fueron un tanto controvertidos, en la actualidad la mayoría de los trabajos coinciden en que los pacientes con la t(11;14) tienen una supervivencia similar o superior a los pacientes sin esta alteración<sup>57-59</sup>.

La t(4;14) (p16;q32) aparece en aproximadamente el 15% de los MM cuando se analizan mediante HSF, ya que es indetectable en el cariotipo. Esta translocación tiene como resultado la desregulación simultánea de 2 genes, el receptor 3 del factor de crecimiento fibroblástico (*FGFR3*), y el myeloma SET domain (*MMSET*)<sup>60</sup>. El *FGFR3* es uno de los receptores tirosín cinasa de alta afinidad para la familia de ligandos *FGF* (factores de crecimiento fibroblástico). El perfil de expresión génica y la RT-PCR han demostrado que sólo el 75% de los MM con t(4;14) presentan un aumento de expresión simultáneo de *MMSET* y *FGFR3*. En el 25% de los casos restantes sólo se observa un aumento en la expresión del *MMSET*, y la ausencia de expresión del *FGFR3* suele ir unida generalmente a la pérdida del derivativo 14<sup>61,62</sup>. Estos datos apuntan a que el gen *MMSET* puede ser crítico en la transformación tumoral de las CP que tienen la t(4;14), mientras que el gen *FGFR3* puede ser prescindible. De hecho, se ha demostrado en modelos de ratón la primera evidencia de que la abolición de la expresión del *MMSET* en células mielomatosas con la t(4;14) reduce el avance tumoral<sup>63</sup>. Aproximadamente en el 10% de los casos, el gen *FGFR3* que se transloca tiene mutaciones activadoras que pueden estar implicadas en la progresión del MM<sup>64</sup>. El pronóstico desfavorable que acarrea esta Tx se ha confirmado en diferentes series de pacientes y en el contexto de estrategias terapéuticas distintas. En la mayoría de estos trabajos, la t(4;14) se muestra como uno de los factores pronósticos independientes de mayor peso. Este impacto negativo en la supervivencia se debe fundamentalmente a las recaídas precoces y no a una reducción en la tasa de respuestas<sup>57,58,65</sup>.

La frecuencia de la t(14;16) (q32;q23) es aproximadamente un 5% y, al igual que la t(4;14), no se detecta en el cariotipo<sup>66</sup>. La t(14;16) provoca un aumento en la expresión del oncogén *c-MAF*, que es un factor de transcripción bZIP<sup>67</sup>. Hasta hace poco se había considerado como una alteración asociada a pronóstico desfavorable atendiendo a los resultados de una serie de pacientes tratados con poliquimioterapia<sup>58,68</sup>. Sin embargo, recientemente no se ha reproducido este impacto negativo en la supervivencia en pacientes tratados con doble trasplante<sup>69</sup>.

El resto de translocaciones que involucran al gen *IGH* son mucho menos frecuentes. Así, la t(6;14) que conlleva un aumento de la expresión de la *ciclina D3*, aparece en menos del 3% de los MM<sup>52</sup>. Una frecuencia similar tiene la t(14;20) que implica al gen *MAFB*, que es un factor de transcripción bZIP al igual que *c-MAF*<sup>70</sup>.

Por otro lado, el reordenamiento del gen *C-MYC*, localizado en 8q24, desempeña un papel central en el control de la proliferación, diferenciación y apoptosis<sup>71</sup>. En el MM tanto las alteraciones cromosómicas que afectan a la región 8q24 como los reordenamientos de *C-MYC* detectados mediante técnicas de biología molecular son infrecuentes. Sin embargo, la expresión aumentada de la proteína C-MYC es un hecho común en esta enfermedad<sup>72</sup>. En este sentido Fonseca *et al* han publicado recientemente que la activación de *C-MYC* en el MM sintomático es un evento común que le diferencia de la GMSI<sup>73</sup>.

### 2.2.2 Ganancias y pérdidas de material cromosómico

#### Monosomía/Delección del cromosoma 13 (*RB1*):

Se trata de la pérdida de material genético más frecuente en el MM (40-50%), tanto si se utilizan técnicas de citogenética convencional, como de HISF<sup>74,75</sup>. Los estudios de HISF destinados a mapear la región mínima comúnmente delecionada, han puesto de manifiesto que en la mayor parte de los casos la pérdida de material del cromosoma 13 es el reflejo de una monosomía y que las deleciones intersticiales son muy raras<sup>76</sup>. Clásicamente, la monosomía del 13 se ha asociado con pronóstico adverso, independientemente de la técnica utilizada para su detección y de la modalidad del tratamiento<sup>74,75</sup>. Sin embargo, los últimos estudios reflejan que la presencia de monosomía 13 de manera aislada, sin otras alteraciones concomitantes, no conlleva

una reducción de supervivencia<sup>57,77</sup>. El gen del retinoblastoma (*RB1*) se encuentra incluido en la región mínima delecionada. Sin embargo, no es frecuente la observación de mutaciones inactivadoras del otro alelo. Por ello, se está investigando la posibilidad de que la haploinsuficiencia de *RB1* participe en la patogenia del MM (Chng *et al*, datos no publicados). Así mismo podría explicar el hecho de que la deleción de 13q sea menos frecuente en los tumores que expresan *CCND2* que en aquellos que expresan *CCND1*.

### Deleción de 17p (*P53*)

La frecuencia de esta deleción es considerablemente más baja (10%) que la monosomía/deleción del cromosoma 13, lo que no ha impedido que en la mayoría de los estudios se perfile como una alteración de pronóstico infausto. En los pacientes con MM en estadios avanzados y en progresión, la proporción de las deleciones de *P53* es bastante más elevada<sup>57,78 77</sup>. El gen supresor tumoral *P53*, localizado en 17p13, ha sido definido como el “guardián del genoma” al prevenir de la acumulación de mutaciones potencialmente oncogénicas. La frecuencia de mutaciones de *P53* en los pacientes con MM al diagnóstico es bastante baja (en torno a un 10%). Recientemente se ha descrito que hasta un 37% de los pacientes con MM y deleción de 17p presentan mutaciones de *P53* en comparación con un 0% en aquellos sin dicha alteración citogenética<sup>79</sup>. Además, parece que la pérdida de *P53* se asocia con la invasión extramedular del MM<sup>80,81</sup>. No obstante, el impacto actual de la deleción monoalélica de 17p13 en la vía de p53, y la posibilidad de desregulación concomitante de otros componentes de la vía, por ejemplo silenciamientos epigenéticos de *P53* o aumento de expresión de *MDM2*, son aspectos que aún necesitan ser aclarados.

### Ganancias de 1q:

La ganancia de 1q es la alteración cromosómica más recurrente en el MM, como lo demuestran tanto los estudios de citogenética como los de HCG<sup>47</sup>. En la mayoría de los casos son el producto de isocromosomas, duplicaciones y traslocaciones “jumping”<sup>82</sup>. El impacto en la supervivencia de esta alteración no se había explorado en profundidad hasta que los estudios de expresión génica mediante microarrays realizados por el grupo de Arkansas, demostraron que el aumento de expresión del gen *CKS1B*,



localizado en 1q21, impartía una mayor agresividad al curso clínico del MM, lo que desembocaba en una reducción significativa de la supervivencia. Esto llevó a explorar si la sobreexpresión de *CKS1B* podría estar relacionada con un incremento en el número de copias de este gen, y se comprobó que había una correlación significativa entre las ganancias y amplificaciones del BAC que contiene el gen *CKS1B* y el alto nivel de expresión de dicho gen. A su vez, se demostró que las ganancias de 1q21 detectadas mediante HSF también constituían un factor independiente de mal pronóstico<sup>83</sup>. Sin embargo, otros grupos no han reproducido este hallazgo, ni cuando han analizado las ganancias de 1q mediante HSF, ni cuando han estudiado el nivel de expresión de *CKS1B*<sup>84</sup>. En estos trabajos, el impacto negativo de la supervivencia desaparece cuando se introducen en el análisis multivariante otras variables de mayor peso.

### 2.2.3 Aneuploidía:

Casi todos los MM son aneuploides, como lo demuestran la medida del contenido de ADN por CMF y las técnicas citogenéticas. De acuerdo con el estatus de ploidía evaluado por cariotipo, los pacientes con MM pueden agruparse en dos grandes categorías: grupo hiperdiploide (más de 46/47 cromosomas) y grupo no hiperdiploide, compuesto de casos diploides, hipodiploides (hasta 44/45 cromosomas), pseudohipodiploides (44/45 a 46/47) y casos casi tetraploides (más de 74)<sup>76,85</sup>. Los MM no hiperdiploides se caracterizan por una prevalencia muy elevada de Tx de *IGH* y monosomía del cromosoma 13<sup>85,86</sup>. Por el contrario, el grupo hiperdiploide está asociado con trisomías recurrentes que afectan especialmente a los cromosomas impares (3, 5, 7, 9, 11, 15 y 19) y con una frecuencia baja de alteraciones estructurales<sup>85</sup>. Los MM hipodiploides se relacionan con una supervivencia más corta. Sin embargo, como esta categoría de MM comprende anomalías genéticas de mal pronóstico, es difícil concluir que la hipodiploidía sea un factor pronóstico independiente.

### 2.2.4 Concomitancia de alteraciones cromosómicas:

En un intento de identificar los pacientes con peor pronóstico, se ha analizado recientemente la asociación entre las alteraciones genéticas detectadas por HSF y la

supervivencia en 1069 pacientes con MM de nuevo diagnóstico<sup>87</sup>. +1q21, del(17p13) y las Tx *IGH* de pronóstico adverso: t(4;14), t(14;16) y t(14;20), fueron las alteraciones con peor supervivencia libre de progresión (SLP) y supervivencia global (SG). Además, estas alteraciones citogenéticas con frecuencia coexistían, y su acumulación se asoció con un decremento progresivo de la supervivencia. Basándose en estos datos, Boyd *et al* establecieron tres grupos pronósticos: grupo de bajo riesgo (ausencia de alteraciones de pronóstico adverso); grupo de riesgo intermedio (una alteración de pronóstico adverso); grupo de alto riesgo (más de una alteración de pronóstico adverso). Esta clasificación presentó valor independiente del International Staging System (ISS), de manera que aquellos enfermos con ISS II ó III y más de una lesión genética, lo que supone el 13.8% de los MM, tenían cortas supervivencias (mediana de SG de 19.4 meses)<sup>87</sup>.

Además, Kumar *et al* han reportado que la presencia de al menos una trisomía de un cromosoma impar en pacientes con MM y del(17p13), t(4;14), t(14;16) o t(14;20), reduce el pronóstico adverso de estas alteraciones citogenéticas<sup>88</sup>.

### **2.3 Alteraciones genómicas detectadas mediante tecnologías de alto rendimiento**

El desarrollo tecnológico, junto con la mejora de las herramientas informáticas, ha permitido la creación de plataformas que realizan el análisis simultáneo de un gran número de genes de una misma muestra. Esta tecnología recibe el nombre de biochips, chips, *arrays* o *microarrays*. A partir de este momento utilizaremos el término de arrays o microarrays, por ser el más extendido. Se puede aplicar por un lado, al estudio de los niveles de expresión de genes mediante el análisis del ARN mensajero de la muestra, y por otro, al estudio de las alteraciones genómicas, básicamente las ganancias y las pérdidas, mediante el análisis del ADN genómico de la muestra de interés.

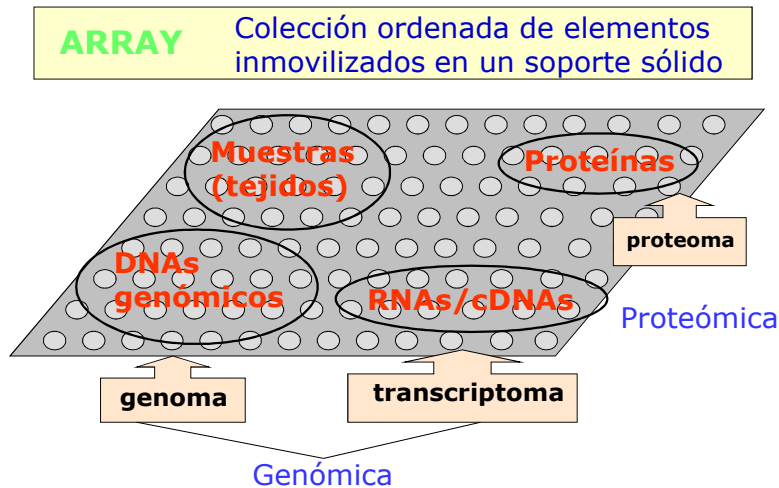


Figura 4: Tipos de arrays

Además, la reciente aplicación de la secuenciación masiva o ultra-secuenciación permite avanzar en el conocimiento genético de las enfermedades en general y el MM en particular.

### 2.3.1 Análisis de ganancias y pérdidas de material cromosómico, y de pérdida de heterocigosidad mediante arrays de SNPs

Con el mismo fundamento de la HCG, ha surgido la técnica denominada matriz-HCG o matriz genómica, en la que la hibridación del DNA tumoral sobre microarrays de cromosomas artificiales de levadura (BAC) o sobre microarrays de oligonucleótidos (arrays de HCG o de polimorfismos de un único nucleótido (SNP)), representativos de todo el genoma, permite detectar cambios genéticos inferiores a 1 Mb<sup>89-94</sup>.

Los arrays de SNPs tienen la ventaja añadida sobre los arrays de HCG de su elevada resolución junto a poder detectar disomías uniparentales (UPD) o pérdidas de heterocigosidad (LOH) sin cambio en el número de copias, esto es, cambios genéticos que conllevan que un gen esté en homocigosis sin existir ni ganancia ni pérdida de material genético. De esta forma, basándose en esta técnica, se ha comprobado la presencia de disomías o trisomías uniparentales asociadas con tumores sólidos y hemopatías malignas. Estos eventos no se pueden identificar ni con el empleo de métodos tradicionales de la citogenética ni con la HCG. Como desventajas se encuentran que no es capaz de detectar las translocaciones balanceadas.

Concepto de pérdida de heterocigosidad (LOH) y disomía uniparental (UPD)

La pérdida de heterocigosidad (LOH) es muy importante por sus implicaciones en la enfermedad en general, y en el cáncer en particular. Puede tener lugar en los siguientes escenarios: deleción, conversión génica, recombinación, error en la mitosis o pérdida cromosómica con posterior duplicación. En este sentido, el ejemplo de LOH más frecuente en las células mielomatosas es la monosomía del cromosoma 13.

Sin embargo, LOH puede ocurrir sin cambio en el número de copias (disomía uniparental –UPD-). Inicialmente la UPD se describió como un trastorno del desarrollo<sup>95</sup>, pero ha demostrado ser un mecanismo muy importante en la inactivación génica de genes supresores tumorales. En este sentido, los casos de las UPD germinales implican la presencia de dos cromosomas homólogos derivados del mismo progenitor, y da lugar a un fenotipo anormal cuando los cromosomas implicados llevan impronta, por lo que los genes de estos cromosomas sólo tienen un alelo activo, es decir, sólo el alelo materno o paterno del par es activo.

Sin embargo, UPD pueden no sólo encontrarse en la línea germinal, sino demostrarse exclusivamente en determinados tejidos (UPD adquiridas), pudiendo jugar en ellos un rol en la carcinogénesis<sup>96</sup>. Se trataría por tanto de una UPD somática que afecta sólo a las células que componen un determinado tejido. En estos casos el origen de la disomía no es la herencia directa, sino un proceso anómalo de replicación del DNA. La importancia de la UPD en la biología del cáncer radica en la inactivación de un alelo de un gen supresor de tumor, que está duplicado. El alelo podría ser inactivado a través de la mutación o de la metilación de la región promotora.

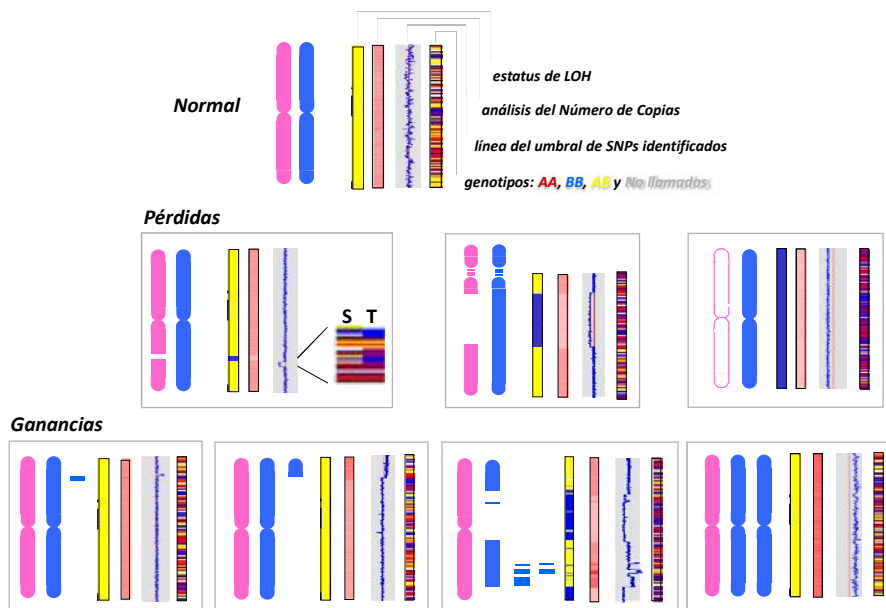


Figura 5: Análisis de la ganancia y pérdida en el número de copias mediante arrays de SNPs

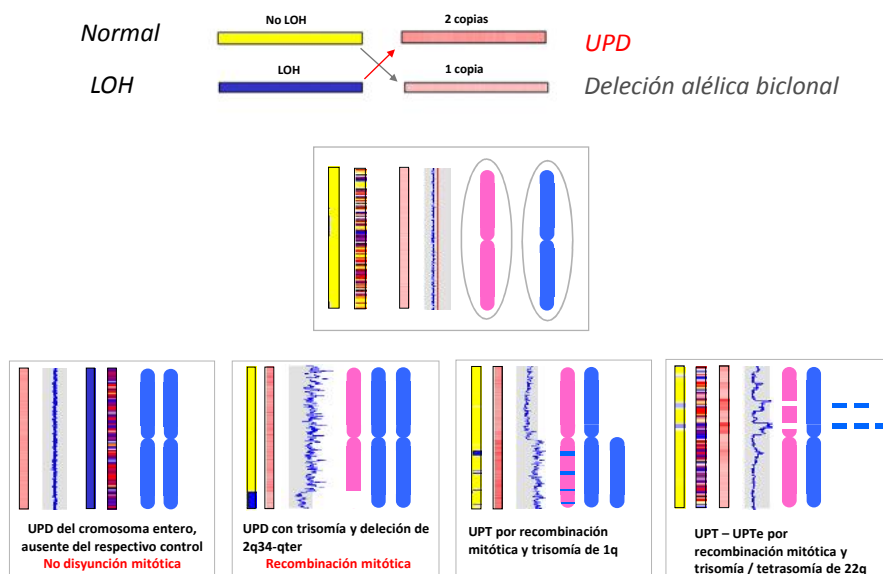


Figura 6: Análisis de las pérdidas de heterocigosidad mediante arrays de SNPs

Experiencia con SNP-arrays en el Mieloma Múltiple

Aunque es una tecnología desarrollada muy recientemente, ya se ha aplicado para el estudio de muchas enfermedades, entre ellas el MM<sup>97-99</sup>. La utilización de esta

tecnología ha permitido confirmar las sospechas de que la práctica totalidad, por no decir todos los MM, presentan alteraciones cromosómicas. La incidencia en los estudios publicados hasta ahora varía desde un 95% hasta un 98%<sup>100, 101, 102</sup>.

Los primeros estudios con arrays de SNPs en MM identificaron que las deleciones más frecuentes afectaban a las regiones 1p (30%), 6q (33%), 8p (25%), 12p (15%), 13q (59%), 14q (39%), 16q (35%), 17p (7%), 20 (12%) y 22 (18%) y las ganancias a 1q (36%) y a los cromosomas impares (3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 y 21) que mayoritariamente exhiben trisomías con frecuencias que abarcan desde el 12% para t21 al 37% para la t15<sup>101, 102</sup>.

Por otro lado se observó un porcentaje no desdeñable de UPD: 8% en 1q, 9% en 16q y 20% en el cromosoma X<sup>101</sup>. A nivel de 16q describieron una alta frecuencia de UPD e identificaron dos genes supresores candidatos: *CYLD* (en el que evidenciaron hasta un 21% de mutaciones en el alelo residual) y *WWOX* (el cual se encontraba infraexpresado en los casos con LOH y que podría ser inactivado también por la traslocación t(14;16)<sup>101</sup>. Así mismo, identificaron genes con importancia pronóstica y funciones relevantes en la biología del MM mediante el análisis de las deleciones homocigotas (*FAM46C*, *TSPYL4*, *PARK2*, *TLR4*, *RB1*, *BIRC2*, *BIRC3*, *TRAF3*, entre otros)<sup>101</sup>.

También se ha analizado el impacto pronóstico de las alteraciones en el número de copias detectadas por arrays de SNP en MM de nuevo diagnóstico<sup>102</sup>. Así, las amplificaciones de los cromosomas 5, 9, 11, 15 y 19 se asociaron con pronóstico favorable mientras que las amplificaciones de 1q y las deleciones de 1p, 12p, 14q y 22q tenían pronóstico desfavorable<sup>102</sup>. El análisis multivariante definió como variable independiente favorable la amplificación de 5q31.3, y como desfavorables la amplificación de 1q23.3 y deleción de 12p13.31<sup>102</sup>. Sin embargo, hay que reseñar que estos resultados no se han reproducido en un análisis posterior de estas dos regiones mediante HSF<sup>103</sup>.

Cabe destacar que no existe en el momento actual, ningún trabajo publicado que analice pacientes con GMSI y MMQ mediante esta técnica.

### 2.3.2 Análisis de la expresión génica mediante microarrays

El análisis de expresión génica mediante microarrays se aplicó por primera vez al estudio del cáncer en 1996<sup>104</sup>. Es una herramienta que permite obtener una visión global de los cambios de expresión que definen la biología y clínica del cáncer.

De *vas et al* fueron los primeros en utilizarla en el MM en el año 2001<sup>105</sup>. El primer paso fue comparar las CP de la MO de donantes sanos con las de sujetos con MM, confirmándose que ambas células presentaban distintos perfiles de expresión génica (GEP), pudiendo diferenciarse basándose en la diferente expresión de 120 de los 6800 genes analizados<sup>105</sup>. En este mismo trabajo se observó que el grupo de MM también era heterogéneo, siendo el GEP capaz de diferenciar hasta 4 subgrupos moleculares: de MM1 a MM4, donde MM1 era más similar a las MGUS, y MM4 a las líneas celulares del MM<sup>105</sup>. Como cabría esperar, el grupo MM4 presentaba mayor incidencia de anomalías citogenéticas y niveles elevados de B2micro (factores por lo tanto asociados con un pronóstico clínico desfavorable)<sup>106</sup>. Consistente con estos datos, los genes que permitían distinguir MM4 de otros grupos estaban relacionados con la proliferación celular<sup>106</sup>. Este estudio supuso la primera evidencia de que el MM abarca diferentes enfermedades que presumiblemente utilizan diferentes mecanismos moleculares para generar una neoplasia con una histología común pero un comportamiento clínico y una biología diferente. Posteriormente, tecnologías más avanzadas de GEP en series más amplias de sujetos han dividido el MM en siete entidades diferentes, como posteriormente se desarrollará.

La alta resolución de las clasificaciones moleculares permite la evaluación retrospectiva de la eficacia de diferentes regímenes de tratamiento según el subgrupo molecular, lo cual es fundamental a la hora de diseñar ensayos clínicos. Por ejemplo, una nueva droga puede no mostrar eficacia de forma global en el MM, pero ser sumamente útil si nos centramos en una de las entidades moleculares, que podría suponer por ejemplo sólo un 5% de la población de sujetos con MM. Además, la identificación de aquellos genes desregulados en estos sujetos puede orientarnos hacia el uso de agentes ya conocidos que podíamos no haber considerado y, asimismo, hacia el desarrollo de nuevas drogas.

Para profundizar en la caracterización molecular de las CP e investigar la contribución de las alteraciones genéticas específicas en la heterogeneidad biológica y clínica de las gammapatías monoclonales, Mattioli *et al* compararon el GEP de CP de 7 casos de GMSI, 39 MM y 6 leucemia de células plasmáticas (LCP)<sup>107</sup>. El cluster del grupo de MM se caracterizó fundamentalmente por la presencia de una de las cinco translocaciones recurrentes que afectan al locus de *IGH*<sup>107</sup>. Los MM con t(14;16) y

t(14;20) presentaron sobreexpresión de *CCND2* y genes envueltos en la adhesión, mientras que aquellos con t(4;14) presentaron sobreexpresión de genes con funciones antiapoptóticas<sup>107</sup>. La peculiaridad de los sujetos con la t(11;14) fue la baja expresión de la subunidad alfa del receptor de IL-6. Finalmente, antígenos asociados con el cáncer testicular fueron específicamente expresados en un subgrupo de pacientes caracterizados por un curso clínico agresivo<sup>107</sup>.

Ahondando en las diferencias entre las CP sanas y tumorales, Jourdan *et al* han publicado un trabajo en el que se centran en 58 genes ligados a la vía de la apoptosis y de la diferenciación de células B<sup>108</sup>. Las CP mielomatosas mostraron sobreexpresión de genes antiapoptóticos tales como *TRAIL*, mientras que *FAS*, *APAF1* y *BNIP3* fueron infraexpresados en este grupo de sujetos<sup>108</sup>.

Por otro lado, Zhan *et al* han analizado el GEP de CP de sujetos sanos y de pacientes con GMSI y MM sintomático, observando que un 27% de los MM presentaron la firma genética de la GMSI<sup>55</sup>. Estos MM, a pesar de presentar una tasa inferior de respuestas completas tras el tratamiento, presentaron un perfil clínico y molecular más favorable, junto a una mejor supervivencia<sup>55</sup>. Además observaron que, de los 20 pacientes que tenían supervivencias prolongadas (>10 años) post trasplante autólogo, 15 poseían la firma genética de la GMSI<sup>55</sup>.

Recientemente Anguiniano *et al* han publicado un trabajo en el cual analizan los GEP de 877 pacientes, incluyendo sujetos sanos y pacientes con GMSI, MMQ y MM (al diagnóstico y a la recaída), hallando que la sobreexpresión de *Myc* junto con el incremento en la inestabilidad cromosómica, son los sucesos que caracterizan la evolución desde la CP normal a la CP del MM en recaída<sup>109</sup>. Además el GEP permitió subclasificar los diferentes estadios del ISS según el fenotipo biológico<sup>109</sup>.

#### *El GEP revela interacciones entre las CP mielomatosas y el micromedioambiente:*

Cada vez son más los estudios que otorgan a la interacción entre las células mielomatosas y el micromedioambiente de la MO un papel fundamental en el desarrollo y progresión del MM. El micromedioambiente medular está integrado por la matriz extracelular (fibronectina, colágeno, laminina y osteopontina) y componentes celulares, que incluyen las células hematopoyéticas, células inmunes, células estromales y endoteliales de la MO, osteoblastos y osteoclastos. Estas interacciones



entre las CP y el micromedioambiente medular serían las responsables de la activación de rutas de señalización que median el crecimiento, la supervivencia, la resistencia a fármacos y la migración de las células mielomatosas, así como la osteoclastogénesis y la angiogénesis. Un paso inicial en la patogénesis del MM implica la adhesión de la CP al micromedioambiente medular gracias a moléculas como CD44, VLA4, VLA5, LFA1, CD56/NCAM, CD54/ICAM1 y CD138/Sindecam 1<sup>110</sup>. La adhesión provoca señales bidireccionales entre las CP y las células estromales que facilitan el asentamiento de las CP en el entorno medular. Sindecam 1 es un proteoglicano transmembrana que se expresa en la mayoría de las células mielomatosas<sup>111</sup>. Su unión al colágeno de la matriz extracelular induce la expresión de la metaloproteasa MMP1 que contribuye a la resorción ósea y a la movilidad de la célula mielomatosa. La VLA4, que también se expresa en las células mielomatosas, interviene en la unión de éstas a la matriz extracelular y a las células estromales a través de la fibronectina y VCAM1. Esta unión induce la activación del NFκB en las CP, lo que las confiere la llamada resistencia a quimioterápicos mediada por la adhesión celular (acrónimo en inglés CAMDR)<sup>112,113</sup>. La interrupción de las interacciones entre la célula mielomatosa y el microambiente medular puede detener el crecimiento y la proliferación de las CP, por lo que se ha convertido en uno de los objetivos de la investigación de nuevos fármacos. Por otro lado, las células mielomatosas y las células estromales intercambian un importante número de citocinas como TNFα, VEGF, TGFβ, IGF1, SDF1a y IL6. La IL6 y el IGF1 están considerados como los factores de proliferación más importantes para la célula mielomatosa, y a su vez proporcionan protección contra la muerte celular inducida por fármacos<sup>110,114,115</sup>. El VEGF también se ha implicado en la proliferación de las CP y puede contribuir a la angiogénesis<sup>116</sup>. Otro grupo de citocinas que puede participar en la patogénesis del MM son las que regulan la muerte celular. Entre ellas, varios miembros de la familia del TNF α, como TRAIL, FASL, APRIL y BAFF. APRIL y BlyS son potentes factores de supervivencia para las células B y están sobre-expresados en las neoplasias de CP, donde parecen actuar tanto por vía autocrina como paracrina<sup>110,117</sup>. Al final, la interacción entre las CP y el micromedioambiente medular, bien directamente a través de las moléculas de adhesión, o indirectamente gracias a las citocinas liberadas por ambos tipos celulares, desemboca en la activación de diferentes rutas de señalización que controlan la proliferación, supervivencia y muerte celular. Un

desequilibrio entre estos procesos daría lugar a la acumulación de CP en la MO. Además de la vía de NFkB están implicadas varias rutas de señalización: la ruta de Ras-Raf-MAPK cinasa (MEK/ERK), la ruta de JAK/STAT y la ruta de P13K/AKT<sup>118,119</sup>. Varias de las citocinas y receptores que controlan la proliferación y supervivencia de la célula mielomatosas afectan a las rutas de MAPK. La ruta de ERK se activa a través de los receptores IL6R, IGF1R, FGFR y VEGFR. Recientemente se ha demostrado que la ruta MEK5/ERK5 también está implicada en la proliferación y supervivencia del MM a través de la estimulación del receptor de la IL-6. Otras dos rutas de MAPK, como p38 y JNK, ejercen funciones importantes en el control del número de células mielomatosas, pero su papel exacto en la biología del MM aún está por ser definido. La activación del receptor de la IL6 también causa estimulación de la cinasa Jak, que a su vez fosforila a STAT3, lo que conduce a la supervivencia de las CP a través de un aumento en la actividad antiapoptótica<sup>110</sup>. La activación de la ruta JAK/STAT origina desregulación de *BCL-XL* y *MCL-1*, dos miembros antiapoptóticos de la familia de BCL-2. También se han descrito alteraciones en el MM de la ruta PI3K/AKT. Una evidencia de que *AKT* participa en la patogenia del MM es el hallazgo de que ciertas líneas de MM tienen *AKT* constitutivamente activo, debido a la inactivación del gen supresor tumoral *PTEN*. La fosforilación de *AKT* se ha encontrado con relativa frecuencia en pacientes con MM, al contrario que en las GMSI en las que esta anomalía aparece rara vez. El estudio de la apoptosis en el MM ha sido objeto de una investigación intensa, especialmente debido al hecho de que las alteraciones de la apoptosis puede explicar la acumulación progresiva de CP en MO más que la proliferación, puesto que el índice de proliferación de la CP mielomatosas es muy bajo. Además muchos agentes antimieloma tienen propiedades proapoptóticas. La vía extrínseca de la apoptosis se activa cuando los ligandos de la familia de NF actúan sobre sus receptores localizados en las CP. En cuanto a la ruta intrínseca, se ha visto activación de caspasas en la muerte de las CP inducida por fármacos. Las interacciones de las CP con el micromedioambiente no constituyen un hecho aislado del resto de los mecanismos patogénicos del MM, ya que por el momento se ha demostrado que ciertas alteraciones genéticas, además de generar un perfil transcripcional y proteómico característico, también regulan interacciones concretas entre las CP y el microambiente medular. Algunos ejemplos son: los MM con la t(4;14) conducen al aumento de expresión de *FGFR3* que activa la

ruta de JAK/STAT provocando supervivencia celular, y además es capaz de inducir proliferación celular sin intervención de la IL6. La sobreexpresión de *MAF* en los casos con t(14;16) provoca la expresión de la integrina B7 que promueve la adhesión celular<sup>68,110</sup>. Las mutaciones puntuales de *TRAF3* llevan a la activación de NFκB y la inactivación del gen supresor *PTEN* conduce a la activación de la ruta de AKT<sup>120</sup>. Las interacciones CP-microambiente medular no sólo favorecen el crecimiento tumoral, sino que también son responsables de manifestaciones clínicas de la enfermedad. Dentro de éstas, las lesiones osteolíticas es el distintivo por antonomasia del MM<sup>121</sup>.

Así mismo, análisis de GEP han proporcionado mayor conocimiento de las interacciones de la célula mielomatosa con el microambiente medular, siendo un ejemplo de ello cómo el uso de GEP reveló que las células mielomatosas sintetizaban de forma aberrante *DKK1*, lo que supuso el desarrollo de un ensayo clínico fase I/II con un inhibidor de *DKK1*, demostrando el potencial translacional de los estudios de GEP. Por lo tanto y después de 10 años realizando GEP a cientos de pacientes con MM en numerosas instituciones, esta técnica está lentamente trasladándose desde los laboratorios de investigación a la práctica clínica.

#### El GEP revela que la desregulación de ciclina D es un evento universal en el MM

Con lo revisado hasta aquí, se puede decir que el MM se caracteriza por una marcada inestabilidad cariotípica y por no tener una alteración cromosómica específica. Aparentemente no hay un mecanismo genético común que explique la patogénesis del MM. Sin embargo, se ha especulado que aunque las diferentes Tx de *IGH* que se observan en el MM inducen la sobre-expresión de oncogenes diferentes, es posible que todas las Tx de *IGH* implicadas en el MM converjan en una vía patogénica común que resulte en el bloqueo de la diferenciación, y en un aumento de la supervivencia y de la proliferación celular. Así, el análisis de expresión génica ha demostrado que la expresión de los genes *CCND1*, *CCND2* y *CCND3* está incrementada en la práctica totalidad de los pacientes con MM. Este hecho podría considerarse como un potencial evento común en la patogénesis del MM<sup>122</sup>. Aproximadamente el 25% de los MM expresan niveles elevados de una de estas ciclinas como consecuencia directa de una Tx de *IGH* como la t(11;14) y la t(6;14), que directamente desregulan *CCND1* y *CCND3* respectivamente, o como efecto indirecto de una de las Tx de *IGH* con los

genes *MAF* (*c-MAF* en 16q23 y *MAFB* en 20q23), que codifican factores de transcripción que actúan sobre la ciclina D2. Casi el 40% de los MM sobre-expresan ciclina D1 a través de una desregulación bialélica de *CCND1* y sin una aparente t(11;14), y la mayoría de los restantes MM, incluidos aquellos con la t(4;14), muestran un aumento de expresión de la ciclina D2. La expresión aumentada de una de estas ciclinas D facilitaría la activación de las cinasas dependientes de ciclinas CDK4 (o CDK6), las cuales subsecuentemente fosforilan e inactivan a RB con lo que el factor de transcripción E2F se libera e induce la progresión del ciclo celular. Los niveles de expresión de las ciclinas D también se han incorporado a la clasificación molecular antes mencionada<sup>106,123</sup>.

#### Clasificación molecular del mieloma múltiple basada en GEP:

Los análisis de la expresión génica del MM mediante microarrays han confirmado la enorme diversidad genética que manifiesta esta neoplasia. Recientemente y tal como se ha señalado previamente, se han propuesto varias clasificaciones del MM en grupos diferentes, cada uno de los cuales posee una firma genética específica que, a su vez, se asocia con un comportamiento clínico característico. Además, varios de estos grupos están marcados por una de las Tx de IGH o por el estatus de ploidía, con lo que se consigue una conexión entre las alteraciones genéticas, el transcriptoma celular y los rasgos clínicos de los pacientes. Se trata de intentos, si bien aún precisan de una amplia validación, de distinguir las entidades genéticas y clínicas que se agrupan bajo el nombre común de MM. En este sentido, Bergsagel y Kuehl desarrollaron una clasificación mediante un análisis supervisado basada en GEP definida por cinco translocaciones recurrentes, trisomías específicas y expresión de ciclina D<sup>123</sup>. 30 genes fueron capaces de separar el MM en 8 clases moleculares (11q13/TC1, 6p21/TC2, 4p16/TC3, *maf*/TC4, *D1*/TC5, *D1+D2*/TC6, *D2*/TC7 y none/TC8) que presentaban correlación con diferentes datos clínicos tales como prevalencia de enfermedad ósea, recaída o progresión a tumor extramedular<sup>122,123</sup>. En un intento de validar esta clasificación, Agnelli *et al* usaron este GEP como modelo predictor sobre CP purificadas de 50 casos de MM<sup>124</sup>. Los TC1, TC2, TC4 y TC5 fueron caracterizados por 112 sondas, pero TC3 mostró un fenotipo heterogéneo y ausencia de biomarcador genético<sup>124</sup>. El TC2, caracterizado por la presencia de copias extras de *CCND1* y ausencia de

traslocaciones de *IGH* o deleciones de 13q, fue caracterizado por sobreexpresión de genes relacionados con la regulación de la transcripción<sup>124</sup>. El fallo para validar todos los grupos moleculares fue probablemente debido al bajo tamaño muestral, a pesar de que no se puede descartar que se deba a que se trate de una clasificación poco robusta. De forma complementaria a la aproximación supervisada expuesta, análisis no supervisados permiten reclasificar los grupos. Así, analizando 351 casos de MM de nuevo diagnóstico, Zhan *et al* dividieron el MM dentro de 7 categorías reproducibles<sup>106</sup>.

Estas clases moleculares, con gran consistencia con la clasificación TC previamente expuesta, están definidas por distintos GEP asociados con lesiones genéticas conocidas, incluyendo la hiperdiploidía, translocaciones, expresión de genes de proliferación celular e interacciones de células tumorales con el micromedioambiente medular<sup>106</sup>. Cuatro (MF, MS, CD-1 y CD-2) de las siete categorías están caracterizadas por la sobreexpresión que resulta de translocaciones cromosómicas recurrentes en aproximadamente el 40% de los MM<sup>125</sup>. La hiperdiploidía está caracterizada por bajos niveles de expresión ectópica de *CCDN1* y sobreexpresión de genes localizados en los cromosomas impares que típicamente exhiben trisomía en el MM. La clase LB (“low-bone disease”), caracterizada por una baja incidencia de lesiones óseas por RMN, expresa niveles elevados de *CCND2* y una constelación de genes que incluyen *endotelina-1/EDN1*. Así, determinados perfiles de expresión génica pueden definir al menos 6 de las 7 entidades. El séptimo grupo (PR –proliferación-) no está relacionado con una lesión genética primaria, pero sí con altos niveles de expresión de genes asociados con la proliferación.

Posteriormente Sonneveld *et al* han añadido tres subgrupos más a la clasificación del grupo de Arkansas: el primero (11.6% de los MM) se caracteriza por sobreexpresión de genes de la ruta de NFkB, tales como *TNFAIP3* y *CD40*; el segundo (6.9%) se caracteriza por sobreexpresión de los antígenos relacionados con el cáncer testicular sin expresión de genes de proliferación; el tercero (2.8%) se caracteriza por la sobreexpresión de *PRL-3*, *PTPRZ1* y *SOCS3*<sup>126</sup>.

Las ganancias y pérdidas genómicas se asocian con GEP particulares:

*GEP y gammapatía monoclonal hiperdiploide:* La combinación de HISF y GEP mostró una desregulación diferencial de genes relacionados con la biosíntesis de proteínas, de maquinaria transcripcional y de fosforilación oxidativa entre los dos tipos de enfermedad (hiperdiploide/no hiperdiploide)<sup>127</sup>. La mayoría de los 204 genes sobreexpresados en la enfermedad hiperdiploide se localizaban en los cromosomas hiperdiploides, mientras que el 29% de los genes sobreexpresados en la enfermedad no hiperdiploide se encontraban en el cromosoma 16q<sup>127</sup>. El MM hiperdiploide se pudo además dividir en dos entidades moleculares y transcripcionales diferentes, una caracterizada por la trisomía del cromosoma 11 y otra sin este hallazgo, pero con ganancias de 1q y deleciones del cromosoma 13<sup>127</sup>. Más aún, Chng *et al* demostraron mediante GEP que el MM hiperdiploide está definido por una firma de biosíntesis y que puede ser dividido en cuatro subgrupos<sup>128</sup>. Uno de ellos, el caracterizado por presencia de antígenos asociados con el cáncer testicular, con desregulación de genes asociados con la proliferación y con mayor índice proliferativo, presenta una supervivencia muy inferior al resto. El segundo grupo, que se caracteriza por la desregulación de genes relacionados con TNF alfa, la vía de NF-kB y de la apoptosis, y que probablemente se corresponda con la entidad hiperdiploide con +1q, -13q junto ausencia de trisomía del 11 y la clase "LB", generalmente presenta buenas respuestas al tratamiento con Bortezomib<sup>128</sup>.

*GEP y deleción del cromosoma 13:* Para confirmar el valor pronóstico de las alteraciones citogenéticas, un grupo de MM fueron evaluados durante un periodo de 9 años. Tan sólo la no hiperdiploidia y la deleción del cromosoma 13, solas o en combinación, se asociaron con pronóstico desfavorable<sup>129</sup>. Además, en 146 pacientes, la deleción del cromosoma 13 detectada por HISF se asoció a infraexpresión de un conjunto de genes localizados en ese cromosoma, entre los que se incluía *RB1*<sup>129</sup>. En un intento de explicar el porqué de que dicha deleción otorgara pronóstico adverso, se propuso que la haploinsuficiencia de estos genes, así como una significativa sobreexpresión de *IGF-1R* pudiera generar un efecto de sobreexpresión de genes del ciclo celular<sup>129</sup>. No obstante y como se ha manifestado anteriormente, estudios posteriores han revelado que el pronóstico adverso de la deleción del cromosoma 13 va unido a la presencia concomitante de otras alteraciones moleculares<sup>74,77</sup>.

*GEP y delección del 17p13/TP53*: Un factor de mal pronóstico en el MM es la delección de 17p13, probablemente debido a pérdida de heterocigosidad de *TP53*, un gen supresor de tumor que transcripcionalmente regula la progresión del ciclo celular y la apoptosis, y es capaz de modular la respuesta celular frente al daño de DNA<sup>80</sup>. Xiong *et al* encontraron que la baja expresión de *TP53* observada en aproximadamente un 10% de los pacientes diagnosticados de novo, se correlaciona con la delección de *TP53* y con un pronóstico adverso, constituyendo un factor de riesgo independiente<sup>130</sup>. De los 122 genes diana de *P53*, sólo unos pocos se correlacionaron con la expresión de *TP53* en las células mielomatosas. La realización de GEP sobre cuatro líneas celulares *TP53* nulas, sobre las que se generó una expresión ectópica de *TP53*, identificó 85 genes diferencialmente expresados (50 sobreexpresados y 35 infraexpresados)<sup>130</sup>. Utilizando estos genes, se realizó posteriormente un análisis no supervisado en 351 MM de nuevo diagnóstico y 90 MM en recaída, el cual reveló dos grandes grupos correlacionados con la expresión de *TP53* y con la supervivencia. Estos datos sugieren que la pérdida de *TP53* en el MM confiere pronóstico adverso y probablemente resulte en la desregulación de un grupo de genes diana de *P53* específicos en el MM y diferente a otras líneas celulares<sup>130</sup>.

#### GEP y estratificación del riesgo:

Para determinar si el GEP al diagnóstico puede ayudar a clasificar el MM en base a su pronóstico, se identificó y se validó en dos amplias cohortes una firma genética de alto riesgo presente en aproximadamente un 15% de los MM de nuevo diagnóstico<sup>131</sup>. El modelo denominado “70/17 genes de alto riesgo” se basa en el patrón de expresión de 70 genes, que se pueden reducir a 17 genes, en los que predomina la sobreexpresión de genes localizados en 1q e infraexpresión de genes localizados en 1p<sup>131</sup>. El GEP de 71 pacientes pareados al diagnóstico y a la recaída mostró un aumento del score medido por el modelo de “70/17” en el 80% de los casos. Ello supuso un impacto en la supervivencia al momento de la recaída en el 58% de los pacientes<sup>131</sup>.

### Utilizando GEP para entender los mecanismos de la enfermedad así como la respuesta al tratamiento

*GEP y antígenos asociados con el cáncer testicular:* estos antígenos se expresan en los testículos y en tumores malignos, pero raramente en tejidos no gametogénicos, lo cual les hace atractivos para ser utilizados como dianas en estrategias de vacunación contra el cáncer. Estudios de GEP han demostrado que los pacientes con MM al diagnóstico expresan un número variable de estos antígenos (98% expresan al menos uno, 86% al menos dos y 70% al menos 3) y que la expresión de seis o más de ellos se asocia con un pronóstico adverso<sup>132</sup>. En concreto, *NY-ESO-1*, cuya expresión es más elevada en el MM con alteraciones citogenéticas, podría ser una diana perfecta para la inmunoterapia en el paciente con MM<sup>133</sup>.

*IGF y IL6:* *IGF-1R* ha sido implicado en la patogenia del cáncer, estando universalmente sobreexpresado en células malignas de diversos tumores, tanto hematológicos como sólidos. De hecho, la sobreexpresión de esta molécula en el MM al diagnóstico confiere pronóstico adverso. In vitro, inhibidores de este receptor tales como anticuerpos neutralizantes, péptidos antagonistas o inhibidores kinasa selectivos (NVP-ADW742) tienen actividad antineoplásica (particularmente en el MM), incluso en casos resistentes a las terapias convencionales<sup>134</sup>. Así mismo, la sobreexpresión de *IL6R* confiere también pronóstico adverso al diagnóstico, encontrándose ambas moléculas desreguladas en uno de los grupos moleculares ("MS"). Por ello, el tratamiento con dianas de *IGFR1* combinado con anti IL 6 es prometedor.

*Estudios de farmacogenómica:* Uno de los caballos de batalla del MM es el desarrollo de la resistencia a drogas, pudiendo el GEP ayudar a identificar los mecanismos de resistencia de cada paciente para individualizar la mejor estrategia de tratamiento. Entre los grupos que han trabajado en ello se encuentran los de Marton, Gray y Cheok<sup>135-137</sup>.

La utilización de GEP ha revelado que la heterogeneidad clínica del MM reproduce una heterogeneidad genética, pudiendo definirse diferentes entidades moleculares. La investigación de los cambios de GEP al diagnóstico y a la recaída, ha proporcionado conocimiento de los mecanismos de la progresión del MM y del desarrollo de la resistencia a drogas. Estudios farmacogenómicos comparando los GEP al diagnóstico y después del tratamiento con un único agente han permitido identificar genes



asociados con respuesta a drogas, contribuyendo a entender los mecanismos por los que actúa el fármaco, siendo este paso clave para la terapia individualizada y el desarrollo de nuevos fármacos.

### 2.3.3 Secuenciación masiva

La aplicación de la secuenciación masiva al MM ha mostrado que existen aproximadamente 35 mutaciones no silentes en cada caso de MM y que hay muy pocas mutaciones genéticas recurrentes en esta enfermedad<sup>138</sup>. Este último dato, que concuerda con lo descrito en otras hemopatías como la LMA, contrasta con lo que ocurre en la tricoleucemia y la LMC, en las que las mutaciones de *BRAF* y de *BCR-ABL*, respectivamente, se ven en un porcentaje muy elevado de casos, incluso del 100% para la tricoleucemia<sup>139</sup>.

Las pocas mutaciones recurrentes que se han observado en el MM mediante secuenciación masiva afectan a oncogenes, como por ejemplo mutaciones activadoras en los oncogenes RAS. En este sentido era ya conocido que, entre los síndromes linfoproliferativos B crónicos, el MM es el que presenta una mayor incidencia de mutaciones (49%), especialmente de N-RAS<sup>140</sup>. Además los pacientes con mutaciones de K-RAS tienen una mayor carga tumoral y corta supervivencia<sup>141</sup>.

### 2.4.4 MicroRNAs

Los MicroRNAs (miRNAs) son pequeñas moléculas de RNA no codificante que regulan la expresión génica a un nivel post-transcripcional y que están implicadas en procesos biológicos críticos entre los que se incluyen el crecimiento celular y la diferenciación.

Varios estudios han mostrado que la expresión de miRNAs está desregulada en las células mielomatosas cuando se compara con las CP normales<sup>142</sup>. Por ejemplo, la expresión de miR-17 ~ 92, localizado en el cromosoma 13, cambia durante el proceso de transformación de GMSI a MM<sup>143</sup>. A pesar de que los genes que codifican los miRNA pueden ser desregulados mediante metilación del DNA, cambio en el número de copias y mediante mutación, la importancia de estos hechos en la patogénesis del MM no se conoce en el momento actual.

Dos trabajos han demostrado la existencia de una asociación entre la expresión de determinados miRNAs y las alteraciones citogenéticas, fundamentalmente las translocaciones de *IGH*<sup>144,145</sup>. En este sentido, Lionetti *et al* demostraron que los MM con t(4;14) presentan una sobreexpresión de let-7e, miR-125a-5p, y miR-99b (localizados en 19q13.33)<sup>145</sup>. En la misma línea, Gutierrez *et al* objetivaron una sobreexpresión de miR-1 y de miR-133a clustered en los MM con t(14;16)<sup>144</sup>.

#### 2.4.5 Metilación y cambios epigenéticos

Existen muchos trabajos dirigidos a estudiar la genética de la célula mielomatososa. Sin embargo, son muy pocos aquellos que investigan la implicación de los cambios epigenéticos en la patogenia de esta enfermedad<sup>146</sup>. El DNA puede ser modificado mediante metilación. Además, la estructura de la cromatina puede ser modificada mediante modificación de histonas, tales como metilación, acetilación, fosforilación y ubiquitinación<sup>147</sup>. Tanto la modificación del DNA como de las histonas pueden jugar un papel en la modulación de la expresión génica<sup>148</sup>.

El cambio epigenético más relevante en la patogenia del MM es la hipometilación global del DNA y la hipermetilación específica del DNA de determinados genes, durante la transformación de GMSI a MM<sup>149</sup>. En este sentido, destaca la hipermetilación específica del DNA del gen *MMSET* en el 15% de los MM con t(4;14), que genera la sobreexpresión de este gen, que promueve la supervivencia celular y la progresión del ciclo celular<sup>150</sup>.

Además, los inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (CDKI) forman una familia de proteínas que realizan un importante control negativo del ciclo celular. La unión de éstos a las quinasas dependientes de ciclinas, fundamentalmente al complejo CDK4/Ciclina D, determina la inhibición de su actividad catalítica, lo que impide la fosforilación de pRb y por tanto la progresión a la fase S del ciclo celular<sup>151</sup>. Los CDKI más estudiados en el MM son las proteínas p15, p16, p18 y p21. En el MM son infrecuentes las deleciones homocigotas de los genes *P15* y *P16*, localizados en 9p21, y de *P18*, localizado en 1p32<sup>152</sup>. Sin embargo, en más de un 50% de los pacientes con MM, *P15* y *P16* se encuentran hipermetilados<sup>153,154</sup>. La proteína p21, localizada en 6p21, protege a las células de la apoptosis impidiendo la finalización del ciclo celular e induciendo la reparación del ADN dañado. A diferencia de lo que ocurre en los

linfocitos B normales la expresión de *p21* se encuentra aumentada en las células mielomatosas, lo que induciría en las mismas, resistencia a la apoptosis<sup>155</sup>.

### 3. ASPECTOS GENÉTICOS DE LAS FASES EVOLUTIVAS DE LAS GAMMAPATÍAS MONOCLONALES

*“In the survival of favored individuals and races, during the constantly-recurring struggle of existence, we see a powerful and ever-acting form of selection”*

*Charles Darwin, biologist, 1859*

#### 3.1 Naturaleza multifásica del cáncer

Durante el último cuarto del siglo XX, y gracias a la biología molecular, se ha establecido y aceptado universalmente el paradigma genético del cáncer: que los tumores surgen como consecuencia de la acumulación de mutaciones en genes que controlan la proliferación, diferenciación o muerte celular. Ello ha permitido empezar a entender la naturaleza multifásica del cáncer, un proceso de múltiples etapas que requiere la acumulación de sucesivos eventos de mutación somática (oncogenes, genes supresores, genes de susceptibilidad) y de selección clonal, que producen variantes en la descendencia celular con propiedades de crecimiento cada vez más agresivas.

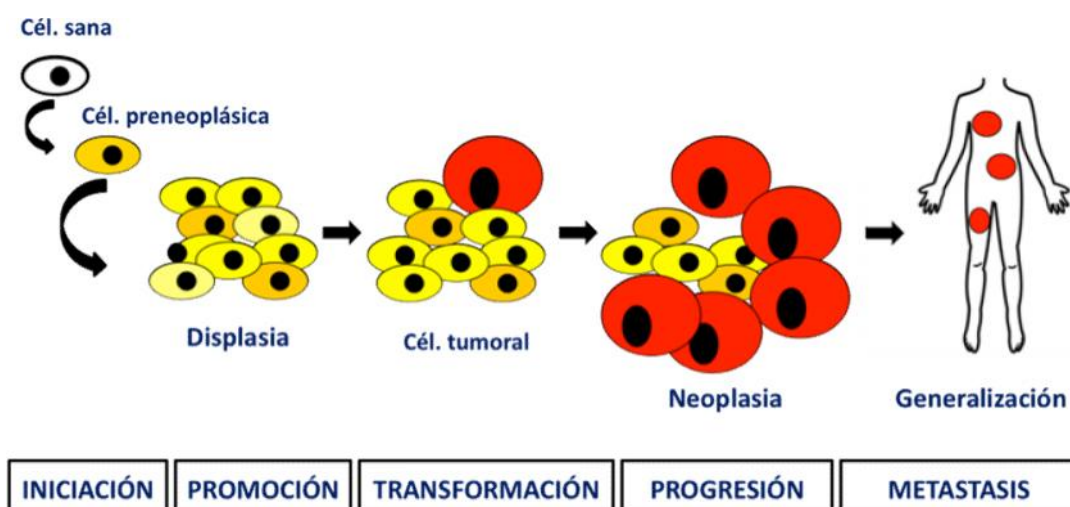
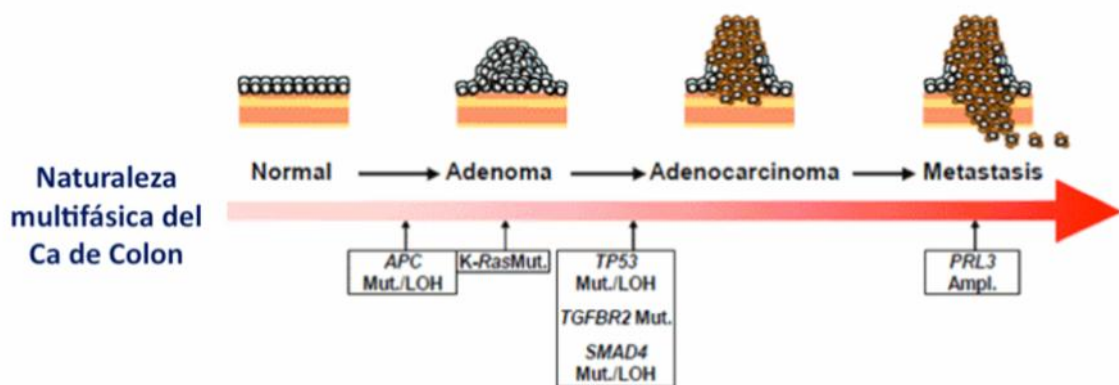


Figura 7: Representación de la naturaleza multifásica del cáncer

Los estudios histopatológicos han sido capaces de evidenciar que el cáncer es el resultado final de un proceso complejo multifásico. El ejemplo más claro lo constituyen los cambios del epitelio intestinal, siendo otros ejemplos el cáncer de próstata y el cáncer de cérvix. Por otro lado, cada vez es más larga es la lista de genes que ha demostrado contribuir en las distintas etapas de la transformación neoplásica. La complejidad de la información es tal que se hace imprescindible seleccionar los genes más relevantes e intentar clasificarlos en un número pequeño de principios biológicos y bioquímicos. En este sentido, algunos estudios indican que el fallo de un número limitado de mecanismos de regulación celular es suficiente para producir un fenotipo tumoral. Ello implica que los cánceres se basan en una serie de principios genéticos y celulares comunes.



**Figura 9: Evidencia histopatológica de la naturaleza multifásica del cáncer.**

*El desarrollo del cáncer sigue en cierta medida las reglas de la evolución Darwiniana*

La evolución Darwiniana implica la expansión de organismos que han sido dotados de genotipos ventajosos y por lo tanto, de fenotipos ventajosos. Un esquema similar parece describir el proceso de progresión tumoral. En este sentido, sobre una población proliferante, una célula determinada puede adquirir una mutación que se traduzca en la generación de un fenotipo ventajoso. A partir de ese momento, esa célula generará una expansión clonal y pasará a ser la población predominante, mientras que el resto de células se eliminarán.

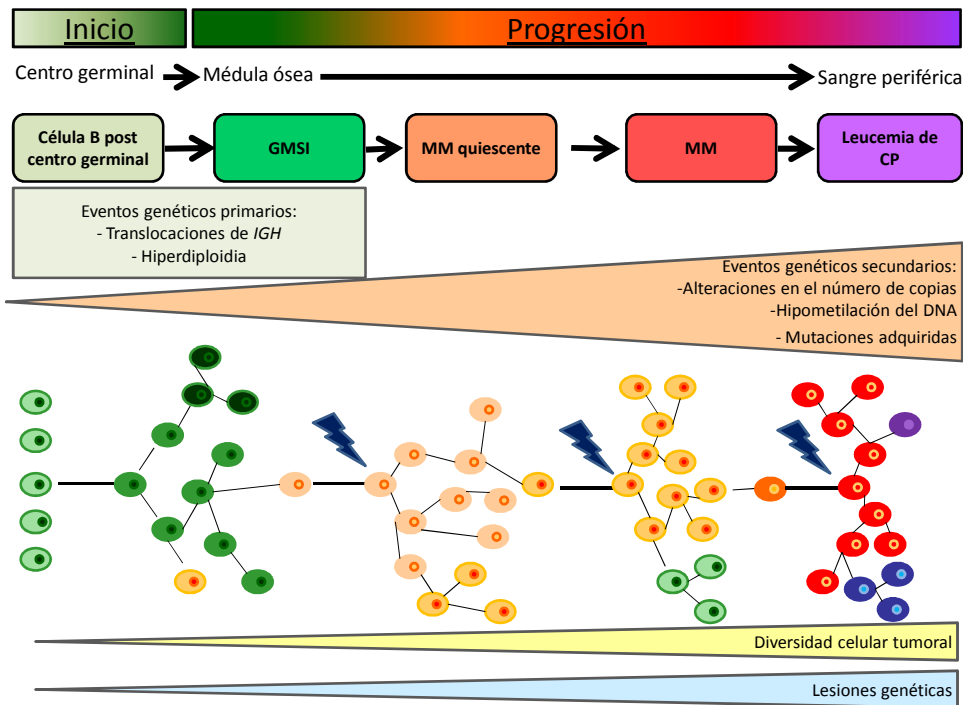


Figura 8: Inicio y progresión del MM. Adaptado de Morgan et al, Nature Reviews Cancer 2012

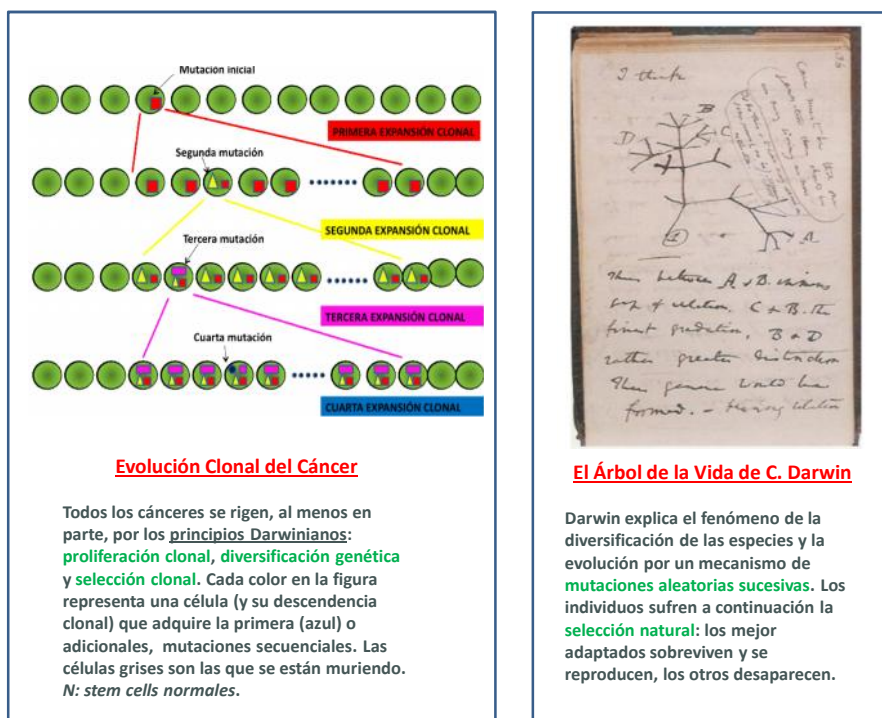


Figura 9: Similitud del fenómeno de diversificación de las especies de Darwin y la evolución clonal del cáncer.

Sobre este modelo de selección clonal, en el que los clones más “resistentes” o con mayor ventaja proliferativa se irían seleccionando, actúan varios factores que intervienen en la selección: las propias características intrínsecas de cada clon, las señales del micromedioambiente y la terapia que actúe sobre las células tumorales<sup>156</sup>.

Ahora bien, la tasa de generación de nuevas mutaciones puede exceder la tasa con la que la selección Darwiniana elimina los clones menos capaces. De esta forma, la masa tumoral llega a estar con el tiempo constituida por un número creciente de subclones distintos, lo que explicaría la enorme heterogeneidad clonal.

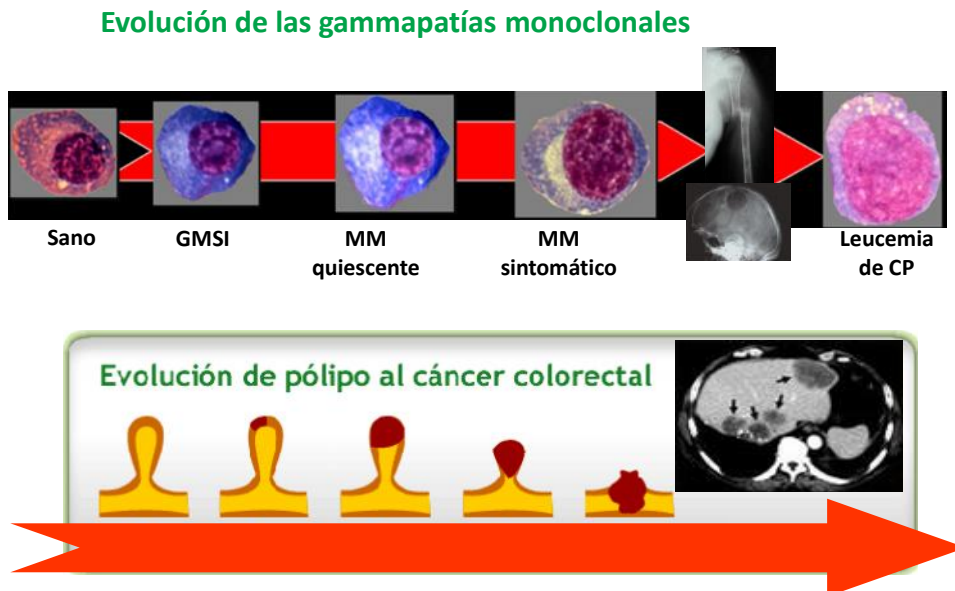
### Evidencias clínicas del modelo de evolución clonal

Son varios los trabajos que han mostrado evidencia clínica del modelo de evolución clonal en hemopatías malignas. Por ejemplo, Mullighan *et al* estudiaron las muestras de MO de 61 pacientes pediátricos con LLA al diagnóstico y en el momento de la recaída mediante SNP-arrays<sup>157</sup>. La mayoría de los casos de recaída estaban relacionados desde el punto de vista genético con el clon leucémico del diagnóstico. En este sentido el clon de la recaída, o bien representaba el clon leucémico del diagnóstico con alteraciones genéticas adquiridas o, más frecuentemente, provenía de un clon ancestral existente antes del diagnóstico. No obstante en ocasiones, el clon a la recaída mostró lesiones genéticas nuevas, manteniendo alguna pero no todas de las alteraciones que presentaba el clon al diagnóstico. El estudio retrospectivo de las muestras al diagnóstico fue capaz de demostrar que el clon de la recaída existía al diagnóstico prácticamente siempre, en forma de subclon minoritario<sup>157</sup>. En un número muy pequeño de casos, el clon de la recaída no estuvo relacionado con el clon leucémico del diagnóstico, pudiendo considerarse una segunda leucemia no relacionada<sup>157</sup>.

### **3.2. Modelo patogénico del MM en etapas. Aspectos genéticos**

Hoy se sabe que la práctica totalidad de los MM tienen una fase preclínica, que por causas aún desconocidas, escapa a los mecanismos reguladores que limitaban su crecimiento, produciéndose finalmente la transformación maligna<sup>8,158</sup>. En este sentido,

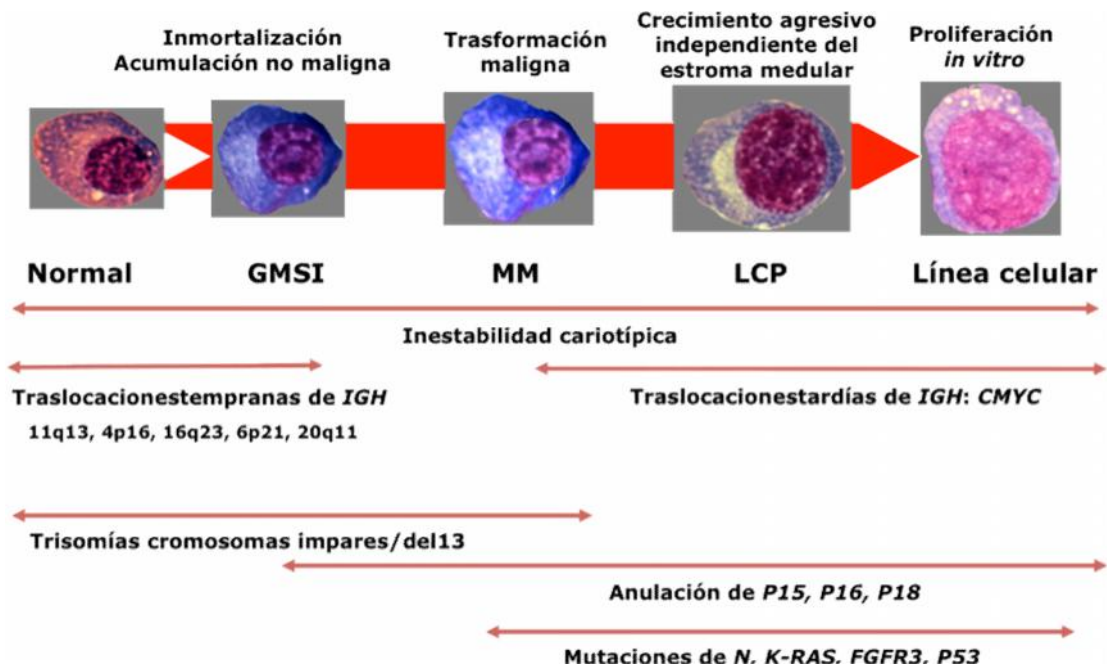
la GMSI y el MMQ son discrasias de células plasmáticas asintomáticas, con capacidad de progresión a MM sintomático. La importancia clínica de establecer diferencias entre estas dos entidades es que ambas difieren de forma significativa en la tasa de progresión a MM sintomático tal como se ha presentado con anterioridad<sup>9</sup>.



**Figura 10:** Transformación en etapas de las gammopatías monoclonales y del cáncer colorectal

En los últimos años, ha habido avances en los modelos de estratificación del riesgo (incluyendo marcadores moleculares). El conocimiento cada vez mayor de los eventos moleculares que desencadenan la progresión de una entidad a otra ayudarán a la identificación de perfiles de riesgo individualizados para pacientes con GMSI y MMQ.

Los datos actuales sugieren que el MM aparece como consecuencia de diferentes pasos oncogénicos desde la CP normal a la CP de la GMSI, donde las células se immortalizan pero no presentan características tumorales, hasta el MM activo, donde las CP son capaces de producir daño orgánico<sup>110,125,159,160</sup>. Hay muchas investigaciones dirigidas a encontrar los mecanismos biológicos que dirigen la progresión a través de la evolución de los diferentes estadios de las GM.



**Figura 11:** Estadios de enfermedad y desarrollo secuencial de alteraciones oncogénicas. *Adaptada de Kuehl y Bergsagel. ASH educational Book, 2005*

### Estudios genéticos:

Por lo que respecta a los estudios citogenéticos, la mayoría de las alteraciones descritas en el MM se han encontrado también en individuos con GMSI<sup>110,125,161-166</sup>. Las mayores diferencias se encuentran entre la CP de un sujeto sano y la CP de una GMSI, siendo la CP de esta entidad mucho más parecida a la CP del MM, que a la CP normal.

En este sentido, se ha observado que la prevalencia de translocaciones de *IGH* en las GMSI es similar a la detectada en los MM, lo cual apoya la hipótesis de que los reordenamientos de *IGH* son sucesos genéticos tempranos en el proceso de tumorigénesis que conduce al MM<sup>67,167</sup>. Respecto a la prevalencia de monosomía/delección del cromosoma 13 en las GMSI hay resultados controvertidos: algunos de ellos señalan una incidencia de monosomía/delección del cromosoma 13 en las GMSI comparable a la vista en los MM<sup>65</sup>, mientras que otros encuentran una proporción de monosomía/delección del 13 significativamente inferior<sup>161,164</sup>. Este último resultado estaría a favor de que la pérdida del cromosoma 13 pudiera influir en la evolución de la GMSI al MM. Por otro lado, el porcentaje de GMSI hiperdiploides es similar al MM<sup>168</sup>. Esto ilustra que la dicotomía hiperdiploide/no hiperdiploide del MM se mantiene en la MGUS y plantea la cuestión de si la inestabilidad cromosómica, con



o sin Tx IGH podría ser un suceso inicial en el desarrollo del MM<sup>168</sup>. Por el contrario, determinadas anomalías genéticas que incluyen desde translocaciones, mutaciones, deleciones y cambios epigenéticos se han asociado con la progresión del MM. Un ejemplo son los reordenamientos de *c-myc*, que están mediados por translocaciones generalmente de desarrollo tardío, que con frecuencia implican a más de dos cromosomas y en ocasiones a secuencias diferentes del gen *IGH*<sup>125</sup>. Las mutaciones activadoras de *RAS* y *FGFR3* se consideran marcadores moleculares de progresión tumoral, ya que la frecuencia de estas mutaciones es baja en las GMSI<sup>64,141</sup>. La desactivación de *P53*, tanto por deleción como por mutación, se asocia con estadios avanzados de la enfermedad y es infrecuente observarla en la GMSI<sup>169,170</sup>. La metilación de los genes *P15* y *P16* se ha detectado en GMSI, pero su frecuencia es mucho más alta en los MM avanzados y en las formas extramedulares de la enfermedad<sup>171,172</sup>.

No obstante, la secuencia temporal de los numerosos eventos genéticos descritos en el MM está aún por definir.

#### Frecuencia de aberraciones cromosómicas

A pesar de que muchos estudios soportan el hecho de que las anomalías genéticas de las GMSI reproducen el espectro del MM, hay discrepancias en cuanto a la distribución de dichas anomalías en las dos entidades. Además, la mayoría de estudios corresponden a series heterogéneas, con un bajo número de GMSI y tampoco aportan datos consistentes en el grupo de MMQ.

Un estudio reciente ha estudiado la frecuencia de las alteraciones citogenéticas en una serie amplia de GMSI, MMQ y MM, utilizando análisis de HSF para detectar translocaciones de *IgH*, deleciones de *RB* y *P53*, y la ploidía<sup>164</sup>. Si bien todas las alteraciones citogenéticas estaban presentes en los diferentes estadios (GMSI, MMQ y MM), la incidencia de deleción de *RB*, t(4;14) y deleción de *P53* era significativamente diferente entre las tres entidades (incrementándose desde GMSI a MM)<sup>164</sup>. Además, encontraron que la proporción de CP portadoras de la deleción de *RB* era significativamente inferior en las GMSI comparadas con el MMQ y el MM<sup>164</sup>. Una explicación posible a este hecho podría ser que la presencia de CP policlonales (también CD138+), más frecuentes en la GMSI, contribuyera a esta diferencia<sup>164,165</sup>. Los

puntos débiles de este trabajo son que sólo estudia en profundidad la delección de *RB*, que utiliza criterios obsoletos de clasificación de las gammapatías monoclonales y que no tiene en cuenta la proporción de CP clonales.

#### Presencia de alteraciones citogenéticas de mal pronóstico en las entidades premalignas:

Varios estudios han descrito la presencia de alteraciones citogenéticas con pronóstico adverso en el MM tanto en la GMSI como en el MMQ<sup>162-165,173</sup>. Hasta el momento, se desconoce si mantienen su valor peyorativo en estas entidades, así como si hay diferencias de algún tipo entre la misma alteración en el MM y en las formas asintomáticas de gammapatía monoclonal.

#### Estudios de ganancias y pérdidas de material genético en las entidades premalignas

Tan solo dos pequeños estudios han analizado las ganancias y pérdidas de material cromosómico de forma global en todo el genoma de las entidades premalignas<sup>174,175</sup>.

En este sentido, Cheng *et al* estudiaron muestras de MO de 19 pacientes con GMSI y 68 pacientes con MM mediante HGC<sup>174</sup>. Todos ellos presentaron alteraciones en el número de copias. Algunas aberraciones cromosómicas fueron relacionadas con la transición de GMSI a MM (-6q, +3p y +1p) y otras con progresión del MM (+2p y +9q)<sup>174</sup>.

En cuanto al MM quiescente, la Dra Rosiñol *et al*, mediante el empleo de HGC y tras definir las subclases de MMQ “evolving” y “no evolving”, encontraron que el grupo de MMQ “evolving” presentaba cambios en común con los MM sintomáticos tales como ganancias de 1q y delecciones de 13q, mientras que el grupo de “no evolving” no mostró ganancias de 1q y las delecciones de 13q fueron poco frecuentes<sup>175</sup>.

#### Estudios de expresión en las entidades premalignas

Una observación muy interesante que se obtuvo cuando se investigaba cómo los patrones de expresión génica cambiaban durante el proceso de transformación en etapas de CP normales a CP mielomatosas es que el número de genes desregulados era menor al comparar las CP normales con las CP de la GMSI (100 genes) que en la transición de GMSI a MM (250 genes)<sup>160</sup>. En otras palabras, la mayoría de los cambios

genéticos ocurrían en el paso de CP normal a CP de la GMSI. Este hecho concuerda con que la mayoría de las alteraciones genéticas vistas en el MM estén descritas en la GMSI.

Aunque hay numerosos trabajos que analizan el GEP del MM, son muy pocos los que comparan las entidades premalignas con el MM sintomático. Mattioli *et al*, compararon el GEP de CP de 7 casos de GMSI, 39 casos de MM y seis de LCP<sup>107</sup>. Los MM fueron heterogéneos a nivel transcripcional, mientras que las GMSI podían distinguirse de las CP de la LCP y de la mayoría de casos de MM mediante la diferente expresión de genes relacionados con el metabolismo del DNA y la proliferación<sup>107</sup>. Zhan *et al* realizaron un trabajo en el que estudiaron los perfiles de expresión génica en CP normales, GMSI y MM y observaron que un 27% de los MM presentaban la firma genética de la GMSI<sup>55</sup>. Estos MM, a pesar de relacionarse con una menor tasa de respuestas completas, se relacionaron con un perfil clínico y molecular de mejor pronóstico y de hecho presentaron una mejor supervivencia. Además, vieron que de los 20 pacientes que tenían larga supervivencia (>10 años) post TASPE, 15 de ellos tenían la firma genética de las GMSI<sup>55</sup>. Recientemente Anguiniano *et al* han publicado un trabajo en el cual estudian los perfiles de expresión génica de 877 pacientes incluyendo sujetos sanos, pacientes con GMSI, MMQ y MM, concluyendo que dichos perfiles constituyen una herramienta pronóstica que puede guiar la decisión de la estrategia terapéutica<sup>109</sup>. En cuanto al estudio del micromedioambiente, Corre *et al* estudiaron mediante GEP las células stem mesenquimales, las únicas con larga vida del micromedioambiente medular, por GEP en pacientes con MM, GMSI y sujetos sanos. 145 genes presentaban una diferente expresión en el MM y en sujetos sanos, y 46% fueron clasificados en la categoría de micromedioambiente tumoral<sup>176</sup>. Los genes sobreexpresados incluyeron factores de crecimiento mielomatosos conocidos, tales como *IL-6*, *amphiregulin*, e *IL-1beta*, factores angiogénicos y proteínas relacionadas con la enfermedad ósea tales como *DKK1*<sup>176</sup>. Perez-Andrés *et al* mostraron diferentes perfiles de expresión de moléculas implicadas en la interacción con el micromedioambiente en GMSI, MM y LCP<sup>177</sup>.

## REFERENCES

1. Altekruse S, Kosary C, Krapcho M. SEER cancer statistics review, 1975-2007. Bethesda, MD: National Cancer Institute. (<http://seer.cancer.gov/csr/1975-2007/index.html>) 2007
2. Kristinsson SY, Landgren O, Dickman PW, Derolf AR, Bjorkholm M. Patterns of survival in multiple myeloma: a population-based study of patients diagnosed in Sweden from 1973 to 2003. *J.Clin.Oncol.* 2007;25:1993-1999.
3. Brenner H, Gondas A, Pulte D. Recent major improvement in long-term survival of younger patients with multiple myeloma. *Blood* 2008;111:2521-2526.
4. Kumar SK, Rajkumar SV, Dispenzieri A et al. Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood* 2008;111:2516-2520.
5. International Myeloma Working Group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br.J Haematol.* 2003;121:749-757.
6. Kyle RA, Durie BG, Rajkumar SV et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management. *Leukemia* 2010;24:1121-1127.
7. Landgren O, Weiss BM. Patterns of monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma in various ethnic/racial groups: support for genetic factors in pathogenesis. *Leukemia* 2009;23:1691-1697.
8. Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood* 2009;113:5412-5417.
9. Kyle RA, Rajkumar SV. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma. *Hematol.Oncol Clin North Am.* 2007;21:1093-113, ix.
10. Kyle RA, Remstein ED, Therneau TM et al. Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *N Engl J Med* 2007;356:2582-2590.
11. Dispenzieri A, Kyle RA, Katzmann JA et al. Immunoglobulin free light chain ratio is an independent risk factor for progression of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *Blood* 2008;111:785-789.
12. Rajkumar SV, Kyle RA, Therneau TM et al. Serum free light chain ratio is an independent risk factor for progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 2005;106:812-817.
13. Perez-Persona E, Vidriales MB, Mateo G et al. New criteria to identify risk of progression in monoclonal gammopathy of uncertain significance and smoldering multiple myeloma based on multiparameter flow cytometry analysis of bone marrow plasma cells. *Blood* 2007;110:2586-2592.
14. Rosinol L, Blade J, Esteve J et al. Smoldering multiple myeloma: natural history and recognition of an evolving type. *Br.J Haematol.* 2003;123:631-636.

15. Korde N, Kristinsson SY, Landgren O. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering multiple myeloma (SMM): novel biological insights and development of early treatment strategies. *Blood* 2011
16. Hjorth M, Hellquist L, Holmberg E et al. Initial versus deferred melphalan-prednisone therapy for asymptomatic multiple myeloma stage I--a randomized study. *Myeloma Group of Western Sweden. Eur.J.Haematol.* 1993;50:95-102.
17. Grignani G, Gobbi PG, Formisano R et al. A prognostic index for multiple myeloma. *Br.J.Cancer* 1996;73:1101-1107.
18. Barlogie B, van RF, Shaughnessy JD, Jr. et al. Seven-year median time to progression with thalidomide for smoldering myeloma: partial response identifies subset requiring earlier salvage therapy for symptomatic disease. *Blood* 2008;112:3122-3125.
19. Martin A, Garcia-Sanz R, Hernandez J et al. Pamidronate induces bone formation in patients with smoldering or indolent myeloma, with no significant anti-tumour effect. *Br.J Haematol.* 2002;118:239-242.
20. Mateos MV, Lopez-Corral L, Hernandez M et al. Smoldering Multiple Myeloma (SMM) At High-Risk of Progression to Symptomatic Disease: A Phase III, Randomized, Multicenter Trial Based On Lenalidomide-Dexamethasone (Len-Dex) As Induction Therapy Followed by Maintenance Therapy with Len Alone Vs No Treatment. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2011;118:991.
21. ClinicalTrialsDatabase. Lenalidomide or Observation in Treating Patients With Asymptomatic High-Risk Smoldering Multiple Myeloma. Available from <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01169337?term=smoldering+myeloma> 2010
22. Attal M, Lauwers Vc, Marit G et al. Maintenance Treatment with Lenalidomide After Transplantation for MYELOMA: Final Analysis of the IFM 2005-02. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2010;116:310.
23. Waxman AJ, Kuehl M, Balakumaran A, Weiss B, Landgren O. Smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: revisiting the clinical dilemma and looking into the future. *Clin.Lymphoma Myeloma Leuk.* 2010;10:248-257.
24. Gutierrez NC, Garcia-Sanz R, San Miguel JF. Molecular biology of myeloma. *Clin.Transl.Oncol.* 2007;9:618-624.
25. Fugmann SD, Lee AI, Shockett PE, Villey IJ, Schatz DG. The RAG proteins and V(D)J recombination: complexes, ends, and transposition. *Annu.Rev.Immunol.* 2000;18:495-527.
26. Honjo T, Kinoshita K, Muramatsu M. Molecular mechanism of class switch recombination: linkage with somatic hypermutation. *Annu.Rev.Immunol.* 2002;20:165-196.
27. Papavasiliou FN, Schatz DG. Somatic hypermutation of immunoglobulin genes: merging mechanisms for genetic diversity. *Cell* 2002;109 Suppl:S35-S44.
28. Kuppers R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat.Rev.Cancer* 2005;5:251-262.
29. Shaffer AL, Rosenwald A, Staudt LM. Lymphoid malignancies: the dark side of B-cell differentiation. *Nat.Rev.Immunol.* 2002;2:920-932.
30. Shapiro-Shelef M, Calame K. Plasma cell differentiation and multiple myeloma. *Curr.Opin.Immunol.* 2004;16:226-234.

31. Rosen L, Vescio R, Berenson JR. Multiple myeloma and chronic lymphocytic leukemia. *Curr.Opin.Hematol.* 1995;2:275-282.
32. Bakkus MH, Heirman C, Van R, I, Van CB, Thielemans K. Evidence that multiple myeloma Ig heavy chain VDJ genes contain somatic mutations but show no intraclonal variation. *Blood* 1992;80:2326-2335.
33. Sahota SS, Leo R, Hamblin TJ, Stevenson FK. Ig VH gene mutational patterns indicate different tumor cell status in human myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 1996;87:746-755.
34. Van Den BH. Chromosomes in plasma-cell malignancies. *Eur.J.Haematol.Suppl* 1989;51:47-51.
35. Zandecki M, Lai JL, Facon T. Multiple myeloma: almost all patients are cytogenetically abnormal. *Br.J.Haematol.* 1996;94:217-227.
36. Lai JL, Zandecki M, Mary JY et al. Improved cytogenetics in multiple myeloma: a study of 151 patients including 117 patients at diagnosis. *Blood* 1995;85:2490-2497.
37. Sawyer JR, Waldron JA, Jagannath S, Barlogie B. Cytogenetic findings in 200 patients with multiple myeloma. *Cancer Genet.Cytogenet.* 1995;82:41-49.
38. Weh HJ, Gutensohn K, Selbach J et al. Karyotype in multiple myeloma and plasma cell leukaemia. *Eur.J.Cancer* 1993;29A:1269-1273.
39. Gould J, Alexanian R, Goodacre A et al. Plasma cell karyotype in multiple myeloma. *Blood* 1988;71:453-456.
40. Dewald GW, Kyle RA, Hicks GA, Greipp PR. The clinical significance of cytogenetic studies in 100 patients with multiple myeloma, plasma cell leukemia, or amyloidosis. *Blood* 1985;66:380-390.
41. Lichter P, Boyle AL, Cremer T, Ward DC. Analysis of genes and chromosomes by nonisotopic in situ hybridization. *Genet.Anal.Tech.Appl.* 1991;8:24-35.
42. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992;258:818-821.
43. du MS, Speicher MR, Joos S et al. Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization. *Hum.Genet.* 1993;90:590-610.
44. Carrasco DR, Tonon G, Huang Y et al. High-resolution genomic profiles define distinct clinicopathogenetic subgroups of multiple myeloma patients. *Cancer Cell* 2006;9:313-325.
45. Cigudosa JC, Rao PH, Calasanz MJ et al. Characterization of nonrandom chromosomal gains and losses in multiple myeloma by comparative genomic hybridization. *Blood* 1998;91:3007-3010.
46. Gutierrez NC, Hernandez JM, Garcia JL et al. Differences in genetic changes between multiple myeloma and plasma cell leukemia demonstrated by comparative genomic hybridization. *Leukemia* 2001;15:840-845.
47. Gutierrez NC, Garcia JL, Hernandez JM et al. Prognostic and biologic significance of chromosomal imbalances assessed by comparative genomic hybridization in multiple myeloma. *Blood* 2004;104:2661-2666.
48. Avet-Loiseau H, Andree-Ashley LE, Moore D et al. Molecular cytogenetic abnormalities in multiple myeloma and plasma cell leukemia measured using comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes.Cancer* 1997;19:124-133.

49. Chesi M, Bergsagel PL, Brents LA et al. Dysregulation of cyclin D1 by translocation into an IgH gamma switch region in two multiple myeloma cell lines. *Blood* 1996;88:674-681.
50. Richelda R, Ronchetti D, Baldini L et al. A novel chromosomal translocation t(4; 14)(p16.3; q32) in multiple myeloma involves the fibroblast growth-factor receptor 3 gene. *Blood* 1997;90:4062-4070.
51. Chesi M, Bergsagel PL, Shonukan OO et al. Frequent dysregulation of the c-maf proto-oncogene at 16q23 by translocation to an Ig locus in multiple myeloma. *Blood* 1998;91:4457-4463.
52. Shaughnessy J, Jr., Gabrea A, Qi Y et al. Cyclin D3 at 6p21 is dysregulated by recurrent chromosomal translocations to immunoglobulin loci in multiple myeloma. *Blood* 2001;98:217-223.
53. Kuehl WM, Bergsagel PL. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat.Rev.Cancer* 2002;2:175-187.
54. Ronchetti D, Finelli P, Richelda R et al. Molecular analysis of 11q13 breakpoints in multiple myeloma. *Blood* 1999;93:1330-1337.
55. Zhan F, Hardin J, Kordsmeier B et al. Global gene expression profiling of multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, and normal bone marrow plasma cells. *Blood* 2002;99:1745-1757.
56. Robillard N, vet-Loiseau H, Garand R et al. CD20 is associated with a small mature plasma cell morphology and t(11;14) in multiple myeloma. *Blood* 2003;102:1070-1071.
57. Gutierrez NC, Castellanos MV, Martin ML et al. Prognostic and biological implications of genetic abnormalities in multiple myeloma undergoing autologous stem cell transplantation: t(4;14) is the most relevant adverse prognostic factor, whereas RB deletion as a unique abnormality is not associated with adverse prognosis. *Leukemia* 2006;21:143-150.
58. Moreau P, Facon T, Leleu X et al. Recurrent 14q32 translocations determine the prognosis of multiple myeloma, especially in patients receiving intensive chemotherapy. *Blood* 2002;100:1579-1583.
59. Fonseca R, Blood EA, Oken MM et al. Myeloma and the t(11;14)(q13;q32); evidence for a biologically defined unique subset of patients. *Blood* 2002;99:3735-3741.
60. Chesi M, Nardini E, Lim RS et al. The t(4;14) translocation in myeloma dysregulates both FGFR3 and a novel gene, MMSET, resulting in IgH/MMSET hybrid transcripts. *Blood* 1998;92:3025-3034.
61. Keats JJ, Reiman T, Maxwell CA et al. In multiple myeloma, t(4;14)(p16;q32) is an adverse prognostic factor irrespective of FGFR3 expression. *Blood* 2003;101:1520-1529.
62. Santra M, Zhan F, Tian E, Barlogie B, Shaughnessy J, Jr. A subset of multiple myeloma harboring the t(4;14)(p16;q32) translocation lacks FGFR3 expression but maintains an IGH/MMSET fusion transcript. *Blood* 2003;101:2374-2376.
63. Lauring J, Abukhdeir AM, Konishi H et al. The multiple myeloma associated MMSET gene contributes to cellular adhesion, clonogenic growth, and tumorigenicity. *Blood* 2008;111:856-864.
64. Chesi M, Nardini E, Brents LA et al. Frequent translocation t(4;14)(p16.3;q32.3) in multiple myeloma is associated with increased expression and activating mutations of fibroblast growth factor receptor 3. *Nat.Genet.* 1997;16:260-264.

65. Fonseca R, Blood E, Rue M et al. Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. *Blood* 2003;101:4569-4575.
66. Chesi M, Bergsagel PL, Shonukan OO et al. Frequent dysregulation of the c-maf proto-oncogene at 16q23 by translocation to an Ig locus in multiple myeloma. *Blood* 1998;91:4457-4463.
67. Bergsagel PL, Kuehl WM. Chromosome translocations in multiple myeloma. *Oncogene* 2001;20:5611-5622.
68. Hurt EM, Wiestner A, Rosenwald A et al. Overexpression of c-maf is a frequent oncogenic event in multiple myeloma that promotes proliferation and pathological interactions with bone marrow stroma. *Cancer Cell* 2004;5:191-199.
69. Avet-Loiseau H, Malard F, Campion L et al. Translocation t(14;16) and multiple myeloma: is it really an independent prognostic factor? *Blood* 2011;117:2009-2011.
70. Kuehl WM, Bergsagel PL. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat.Rev.Cancer* 2002;2:175-187.
71. Amati B, Land H. Myc-Max-Mad: a transcription factor network controlling cell cycle progression, differentiation and death. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 1994;4:102-108.
72. Kuehl WM, Brents LA, Chesi M, Huppi K, Bergsagel PL. Dysregulation of c-myc in multiple myeloma. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 1997;224:277-282.
73. Chng WJ, Huang GF, Chung TH et al. Clinical and biological implications of MYC activation: a common difference between MGUS and newly diagnosed multiple myeloma. *Leukemia* 2011;25:1026-1035.
74. Gutierrez NC, Hernandez JM, Garcia JL et al. Correlation between cytogenetic abnormalities and disease characteristics in multiple myeloma: monosomy of chromosome 13 and structural abnormalities of 11q are associated with a high percentage of S-phase plasma cells. *Haematologica* 2000;85:1146-1152.
75. Fonseca R, Harrington D, Oken MM et al. Biological and prognostic significance of interphase fluorescence in situ hybridization detection of chromosome 13 abnormalities (delta13) in multiple myeloma: an eastern cooperative oncology group study. *Cancer Res.* 2002;62:715-720.
76. Fonseca R, Barlogie B, Bataille R et al. Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: a workshop report. *Cancer Res.* 2004;64:1546-1558.
77. Avet-Loiseau H, Attal M, Moreau P et al. Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myelome. *Blood* 2007;109:3489-3495.
78. Gertz MA, Lacy MQ, Dispenzieri A et al. Clinical implications of t(11;14)(q13;q32), t(4;14)(p16.3;q32), and -17p13 in myeloma patients treated with high-dose therapy. *Blood* 2005;106:2837-2840.
79. Lode L, Eveillard M, Trichet V et al. Mutations in TP53 are exclusively associated with del(17p) in multiple myeloma. *Haematologica* 2010;95:1973-1976.
80. Chng WJ, Price-Troska T, Gonzalez-Paz N et al. Clinical significance of TP53 mutation in myeloma. *Leukemia* 2007;21:582-584.
81. Lopez-Anglada L, Gutierrez NC, Garcia JL et al. P53 deletion may drive the clinical evolution and treatment response in multiple myeloma. *Eur.J.Haematol.* 2010;84:359-361.



82. Sawyer JR, Tricot G, Lukacs JL et al. Genomic instability in multiple myeloma: evidence for jumping segmental duplications of chromosome arm 1q. *Genes Chromosomes.Cancer* 2005;42:95-106.
83. Hanamura I, Stewart JP, Huang Y et al. Frequent gain of chromosome band 1q21 in plasma-cell dyscrasias detected by fluorescence in situ hybridization: incidence increases from MGUS to relapsed myeloma and is related to prognosis and disease progression following tandem stem-cell transplantation. *Blood* 2006;108:1724-1732.
84. Fonseca R, Van Wier SA, Chng WJ et al. Prognostic value of chromosome 1q21 gain by fluorescent in situ hybridization and increase CKS1B expression in myeloma. *Leukemia* 2006;20:2034-2040.
85. Smadja NV, Leroux D, Soulier J et al. Further cytogenetic characterization of multiple myeloma confirms that 14q32 translocations are a very rare event in hyperdiploid cases. *Genes Chromosomes.Cancer* 2003;38:234-239.
86. Fonseca R, bes-Marun CS, Picken EB et al. The recurrent IgH translocations are highly associated with nonhyperdiploid variant multiple myeloma. *Blood* 2003;102:2562-2567.
87. Boyd KD, Ross FM, Chiecchio L et al. A novel prognostic model in myeloma based on co-segregating adverse FISH lesions and the ISS: analysis of patients treated in the MRC Myeloma IX trial. *Leukemia* 2012;26:349-355.
88. Kumar S, Fonseca R, Ketterling RP et al. Trisomies in multiple myeloma: impact on survival in patients with high-risk cytogenetics. *Blood* 2012;119:2100-2105.
89. Barrett MT, Scheffer A, Ben-Dor A et al. Comparative genomic hybridization using oligonucleotide microarrays and total genomic DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2004;101:17765-17770.
90. van d, I, Tijssen M, Chin SF et al. Human and mouse oligonucleotide-based array CGH. *Nucleic Acids Res.* 2005;33:e192.
91. Selzer RR, Richmond TA, Pofahl NJ et al. Analysis of chromosome breakpoints in neuroblastoma at sub-kilobase resolution using fine-tiling oligonucleotide array CGH. *Genes Chromosomes.Cancer* 2005;44:305-319.
92. Huang J, Wei W, Zhang J et al. Whole genome DNA copy number changes identified by high density oligonucleotide arrays. *Hum.Genomics* 2004;1:287-299.
93. Nannya Y, Sanada M, Nakazaki K et al. A robust algorithm for copy number detection using high-density oligonucleotide single nucleotide polymorphism genotyping arrays. *Cancer Res.* 2005;65:6071-6079.
94. Slater HR, Bailey DK, Ren H et al. High-resolution identification of chromosomal abnormalities using oligonucleotide arrays containing 116,204 SNPs. *Am.J.Hum.Genet.* 2005;77:709-726.
95. Engel E. A new genetic concept: uniparental disomy and its potential effect, isodisomy. *Am.J.Med.Genet.* 1980;6:137-143.
96. Lapunzina P, Monk D. The consequences of uniparental disomy and copy number neutral loss-of-heterozygosity during human development and cancer. *Biol.Cell* 2011;103:303-317.
97. Sellick GS, Longman C, Tolmie J et al. Genomewide linkage searches for Mendelian disease loci can be efficiently conducted using high-density SNP genotyping arrays. *Nucleic Acids Res.* 2004;32:e164.

98. de LN, Hehir-Kwa JY, Simons A et al. SNP array analysis in constitutional and cancer genome diagnostics--copy number variants, genotyping and quality control. *Cytogenet.Genome Res.* 2011;135:212-221.
99. Bacolod MD, Schemmann GS, Giardina SF et al. Emerging paradigms in cancer genetics: some important findings from high-density single nucleotide polymorphism array studies. *Cancer Res.* 2009;69:723-727.
100. Walker BA, Leone PE, Jenner MW et al. Integration of global SNP-based mapping and expression arrays reveals key regions, mechanisms, and genes important in the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood* 2006;108:1733-1743.
101. Walker BA, Leone PE, Chiecchio L et al. A compendium of myeloma-associated chromosomal copy number abnormalities and their prognostic value. *Blood* 2010;116:e56-e65.
102. Avet-Loiseau H, Li C, Magrangeas F et al. Prognostic significance of copy-number alterations in multiple myeloma. *J.Clin.Oncol.* 2009;27:4585-4590.
103. Tapper W, Chiecchio L, Dagrada GP et al. Heterogeneity in the prognostic significance of 12p deletion and chromosome 5 amplification in multiple myeloma. *J.Clin.Oncol.* 2011;29:e37-e39.
104. DeRisi J, Penland L, Brown PO et al. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat.Genet.* 1996;14:457-460.
105. De VJ, Couderc G, Tarte K et al. Identifying intercellular signaling genes expressed in malignant plasma cells by using complementary DNA arrays. *Blood* 2001;98:771-780.
106. Zhan F, Huang Y, Colla S et al. The molecular classification of multiple myeloma. *Blood* 2006;108:2020-2028.
107. Mattioli M, Agnelli L, Fabris S et al. Gene expression profiling of plasma cell dyscrasias reveals molecular patterns associated with distinct IGH translocations in multiple myeloma. *Oncogene* 2005;24:2461-2473.
108. Jourdan M, Reme T, Goldschmidt H et al. Gene expression of anti- and pro-apoptotic proteins in malignant and normal plasma cells. *Br.J.Haematol.* 2009;145:45-58.
109. Anguiano A, Tuchman SA, Acharya C et al. Gene expression profiles of tumor biology provide a novel approach to prognosis and may guide the selection of therapeutic targets in multiple myeloma. *J.Clin.Oncol.* 2009;27:4197-4203.
110. Hideshima T, Bergsagel PL, Kuehl WM, Anderson KC. Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. *Blood* 2004;104:607-618.
111. Sanderson RD, Turnbull JE, Gallagher JT, Lander AD. Fine structure of heparan sulfate regulates syndecan-1 function and cell behavior. *J.Biol.Chem.* 1994;269:13100-13106.
112. Damiano JS, Cress AE, Hazlehurst LA, Shtil AA, Dalton WS. Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines. *Blood* 1999;93:1658-1667.
113. Landowski TH, Olashaw NE, Agrawal D, Dalton WS. Cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR) is associated with activation of NF-kappa B (RelB/p50) in myeloma cells. *Oncogene* 2003;22:2417-2421.
114. Mitsiades CS, Mitsiades N, Munshi NC, Anderson KC. Focus on multiple myeloma. *Cancer Cell* 2004;6:439-444.

115. Mitsiades CS, Mitsiades NS, McMullan CJ et al. Inhibition of the insulin-like growth factor receptor-1 tyrosine kinase activity as a therapeutic strategy for multiple myeloma, other hematologic malignancies, and solid tumors. *Cancer Cell* 2004;5:221-230.
116. Podar K, Anderson KC. The pathophysiologic role of VEGF in hematologic malignancies: therapeutic implications. *Blood* 2005;105:1383-1395.
117. Klein B, Tarte K, Jourdan M et al. Survival and proliferation factors of normal and malignant plasma cells. *Int.J.Hematol.* 2003;78:106-113.
118. Hideshima T, Mitsiades C, Tonon G, Richardson PG, Anderson KC. Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets. *Nat.Rev.Cancer* 2007;7:585-598.
119. Carvajal-Vergara X, Tabera S, Montero JC et al. Multifunctional role of Erk5 in multiple myeloma. *Blood* 2005;105:4492-4499.
120. Keats JJ, Fonseca R, Chesi M et al. Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma. *Cancer Cell* 2007;12:131-144.
121. Roodman GD. Pathogenesis of myeloma bone disease. *Blood Cells Mol.Dis.* 2004;32:290-292.
122. Bergsagel PL, Kuehl WM, Zhan F et al. Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood* 2005;106:296-303.
123. Bergsagel PL, Kuehl WM. Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma. *J.Clin.Oncol.* 2005;23:6333-6338.
124. Agnelli L, Biccato S, Mattioli M et al. Molecular classification of multiple myeloma: a distinct transcriptional profile characterizes patients expressing CCND1 and negative for 14q32 translocations. *J.Clin.Oncol.* 2005;23:7296-7306.
125. Kuehl WM, Bergsagel PL. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat.Rev.Cancer* 2002;2:175-187.
126. Broyl A, Hose D, Lokhorst H et al. Gene expression profiling for molecular classification of multiple myeloma in newly diagnosed patients. *Blood* 2010;116:2543-2553.
127. Agnelli L, Fabris S, Biccato S et al. Upregulation of translational machinery and distinct genetic subgroups characterise hyperdiploidy in multiple myeloma. *Br.J.Haematol.* 2007;136:565-573.
128. Chng WJ, Kumar S, Vanwier S et al. Molecular dissection of hyperdiploid multiple myeloma by gene expression profiling. *Cancer Res.* 2007;67:2982-2989.
129. Shaughnessy J, Jacobson J, Sawyer J et al. Continuous absence of metaphase-defined cytogenetic abnormalities, especially of chromosome 13 and hypodiploidy, ensures long-term survival in multiple myeloma treated with Total Therapy I: interpretation in the context of global gene expression. *Blood* 2003;101:3849-3856.
130. Xiong W, Wu X, Starnes S et al. An analysis of the clinical and biologic significance of TP53 loss and the identification of potential novel transcriptional targets of TP53 in multiple myeloma. *Blood* 2008;112:4235-4246.
131. Shaughnessy JD, Jr., Zhan F, Burington BE et al. A validated gene expression model of high-risk multiple myeloma is defined by deregulated expression of genes mapping to chromosome 1. *Blood* 2007;109:2276-2284.

132. Condomines M, Hose D, Raynaud P et al. Cancer/testis genes in multiple myeloma: expression patterns and prognosis value determined by microarray analysis. *J.Immunol.* 2007;178:3307-3315.
133. van RF, Szmania SM, Zhan F et al. NY-ESO-1 is highly expressed in poor-prognosis multiple myeloma and induces spontaneous humoral and cellular immune responses. *Blood* 2005;105:3939-3944.
134. Sabbatini P, Rowand JL, Groy A et al. Antitumor activity of GSK1904529A, a small-molecule inhibitor of the insulin-like growth factor-I receptor tyrosine kinase. *Clin.Cancer Res.* 2009;15:3058-3067.
135. Marton MJ, DeRisi JL, Bennett HA et al. Drug target validation and identification of secondary drug target effects using DNA microarrays. *Nat.Med.* 1998;4:1293-1301.
136. Gray NS, Wodicka L, Thunnissen AM et al. Exploiting chemical libraries, structure, and genomics in the search for kinase inhibitors. *Science* 1998;281:533-538.
137. Cheok MH, Yang W, Pui CH et al. Treatment-specific changes in gene expression discriminate in vivo drug response in human leukemia cells. *Nat.Genet.* 2003;34:85-90.
138. Chapman MA, Lawrence MS, Keats JJ et al. Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature* 2011;471:467-472.
139. Tiacci E, Trifonov V, Schiavoni G et al. BRAF mutations in hairy-cell leukemia. *N.Engl.J.Med.* 2011;364:2305-2315.
140. Neri A, Knowles DM, Greco A, McCormick F, Ia-Favera R. Analysis of RAS oncogene mutations in human lymphoid malignancies. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1988;85:9268-9272.
141. Liu P, Leong T, Quam L et al. Activating mutations of N- and K-ras in multiple myeloma show different clinical associations: analysis of the Eastern Cooperative Oncology Group Phase III Trial. *Blood* 1996;88:2699-2706.
142. Benetatos L, Vartholomatos G. Deregulated microRNAs in multiple myeloma. *Cancer* 2012;118:878-887.
143. Pichiorri F, Suh SS, Ladetto M et al. MicroRNAs regulate critical genes associated with multiple myeloma pathogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2008;105:12885-12890.
144. Gutierrez NC, Sarasquete ME, Misiewicz-Krzeminska I et al. Deregulation of microRNA expression in the different genetic subtypes of multiple myeloma and correlation with gene expression profiling. *Leukemia* 2010;24:629-637.
145. Lionetti M, Biasiolo M, Agnelli L et al. Identification of microRNA expression patterns and definition of a microRNA/mRNA regulatory network in distinct molecular groups of multiple myeloma. *Blood* 2009;114:e20-e26.
146. Sharma A, Heuck CJ, Fazzari MJ et al. DNA methylation alterations in multiple myeloma as a model for epigenetic changes in cancer. *Wiley.Interdiscip.Rev.Syst.Biol.Med.* 2010;2:654-669.
147. Chi P, Allis CD, Wang GG. Covalent histone modifications--miswritten, misinterpreted and mis-erased in human cancers. *Nat.Rev.Cancer* 2010;10:457-469.
148. Cedar H, Bergman Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat.Rev.Genet.* 2009;10:295-304.

149. Walker BA, Wardell CP, Chiecchio L et al. Aberrant global methylation patterns affect the molecular pathogenesis and prognosis of multiple myeloma. *Blood* 2011;117:553-562.
150. Nimura K, Ura K, Shiratori H et al. A histone H3 lysine 36 trimethyltransferase links Nkx2-5 to Wolf-Hirschhorn syndrome. *Nature* 2009;460:287-291.
151. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 1993;366:704-707.
152. Tasaka T, Berenson J, Vescio R et al. Analysis of the p16INK4A, p15INK4B and p18INK4C genes in multiple myeloma. *Br.J.Haematol.* 1997;96:98-102.
153. Tasaka T, Asou H, Munker R et al. Methylation of the p16INK4A gene in multiple myeloma. *Br.J.Haematol.* 1998;101:558-564.
154. Ng MH, Chung YF, Lo KW et al. Frequent hypermethylation of p16 and p15 genes in multiple myeloma. *Blood* 1997;89:2500-2506.
155. Urashima M, Teoh G, Chauhan D et al. Interleukin-6 overcomes p21WAF1 upregulation and G1 growth arrest induced by dexamethasone and interferon-gamma in multiple myeloma cells. *Blood* 1997;90:279-289.
156. Greaves M. Cancer stem cells: back to Darwin? *Semin.Cancer Biol.* 2010;20:65-70.
157. Mullighan CG, Phillips LA, Su X et al. Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Science* 2008;322:1377-1380.
158. Weiss BM, Abadie J, Verma P, Howard RS, Kuehl WM. A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients. *Blood* 2009;113:5418-5422.
159. Hallek M, Leif Bergsagel P, Anderson KC. Multiple Myeloma: Increasing Evidence for a Multistep Transformation Process. *Blood* 1998;91:3-21.
160. Davies FE, Dring AM, Li C et al. Insights into the multistep transformation of MGUS to myeloma using microarray expression analysis. *Blood* 2003;102:4504-4511.
161. Avet-Loiseau H, Li JY, Morineau N et al. Monosomy 13 Is Associated With the Transition of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance to Multiple Myeloma. *Blood* 1999;94:2583-2589.
162. Avet-Loiseau H, Facon T, Grosbois B et al. Oncogenesis of multiple myeloma: 14q32 and 13q chromosomal abnormalities are not randomly distributed, but correlate with natural history, immunological features, and clinical presentation. *Blood* 2002;99:2185-2191.
163. Bochtler T, Hegenbart U, Cremer FW et al. Evaluation of the cytogenetic aberration pattern in amyloid light chain amyloidosis as compared with monoclonal gammopathy of undetermined significance reveals common pathways of karyotypic instability. *Blood* 2008;111:4700-4705.
164. Chiecchio L, Dagrada GP, Ibrahim AH et al. Timing of acquisition of deletion 13 in plasma cell dyscrasias is dependent on genetic context. *Haematologica* 2009;94:1708-1713.
165. Fonseca R, Bailey RJ, Ahmann GJ et al. Genomic abnormalities in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 2002;100:1417-1424.
166. Kaufmann H, Ackermann J, Baldia C et al. Both IGH translocations and chromosome 13q deletions are early events in monoclonal gammopathy of undetermined significance and do not evolve during transition to multiple myeloma. *Leukemia* 2004;18:1879-1882.

167. Chng WJ, Glebov O, Bergsagel PL, Kuehl WM. Genetic events in the pathogenesis of multiple myeloma. *Best.Pract.Res.Clin.Haematol.* 2007;20:571-596.
168. Chng WJ, Van Wier SA, Ahmann GJ et al. A validated FISH trisomy index demonstrates the hyperdiploid and nonhyperdiploid dichotomy in MGUS. *Blood* 2005;106:2156-2161.
169. Drach J, Ackermann J, Fritz E et al. Presence of a p53 gene deletion in patients with multiple myeloma predicts for short survival after conventional-dose chemotherapy. *Blood* 1998;92:802-809.
170. Neri A, Baldini L, Trecca D et al. p53 gene mutations in multiple myeloma are associated with advanced forms of malignancy. *Blood* 1993;81:128-135.
171. Mateos MV, Garcia-Sanz R, Lopez-Perez R et al. p16/INK4a gene inactivation by hypermethylation is associated with aggressive variants of monoclonal gammopathies. *Hematol.J.* 2001;2:146-149.
172. Guillerm G, Gyan E, Wolowiec D et al. p16(INK4a) and p15(INK4b) gene methylations in plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 2001;98:244-246.
173. Fonseca R, Oken MM, Greipp PR. The t(4;14)(p16.3;q32) is strongly associated with chromosome 13 abnormalities in both multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 2001;98:1271-1272.
174. Cheng SH, Ng MH, Lau KM et al. 4q loss is potentially an important genetic event in MM tumorigenesis: identification of a tumor suppressor gene regulated by promoter methylation at 4q13.3, platelet factor 4. *Blood* 2007;109:2089-2099.
175. Rosinol L, Carrio A, Blade J et al. Comparative genomic hybridisation identifies two variants of smoldering multiple myeloma. *Br.J.Haematol.* 2005;130:729-732.
176. Corre J, Mahtouk K, Attal M et al. Bone marrow mesenchymal stem cells are abnormal in multiple myeloma. *Leukemia* 2007;21:1079-1088.
177. Perez-Andres M, Almeida J, Martin-Ayuso M et al. Clonal plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma and plasma cell leukemia show different expression profiles of molecules involved in the interaction with the immunological bone marrow microenvironment. *Leukemia* 2005;19:449-455.

## **Hipótesis de trabajo y objetivos**





## 1. HIPÓTESIS DE TRABAJO:

Los estudios epidemiológicos han demostrado que la práctica totalidad de los MM están precedidos por una fase premaligna. En este sentido, la GMSI y el MMQ se consideran entidades premalignas y asintomáticas con capacidad de evolucionar a MM sintomático. La importancia clínica de establecer diferencias entre ellas es que difieren de forma significativa en la tasa de progresión a MM sintomático.

A pesar de su comportamiento clínico radicalmente distinto, las 3 entidades comparten aparentemente la misma célula neoplásica, que es una CP clonal y aberrante. La citogenética y la hibridación *in situ* fluorescente (HISF) no han conseguido identificar alteraciones características de cada estadio evolutivo. De hecho, la mayoría de las alteraciones descritas en el MM se han encontrado también en la GMSI, incluyendo, sorprendentemente, aquellas de conocido pronóstico adverso en el MM. Sin embargo, esto podría ser debido: 1) a que no exista un sello genético específico de cada fase evolutiva de las gammapatías monoclonales; 2) a que no se hayan utilizado las herramientas y los análisis adecuados para su búsqueda.

Con el fin de desentrañar nuevos mecanismos patogénicos en la historia natural de progresión en etapas de las gammapatías monoclonales, nos proponemos analizar la heterogeneidad clonal de las anomalías citogenéticas recurrentes en la GMSI, el MMQ y el MM mediante HISF. Además, para averiguar si las tecnologías genómicas de alta resolución son capaces de establecer diferencias y esclarecer nuevas rutas biológicas relevantes en la patogenia, se llevará a cabo un análisis genómico pionero, tanto a nivel de cambios en el número de copias de DNA, como de expresión génica en los diferentes estadios de las GM.

Por otro lado nos proponemos estudiar en profundidad el MMQ, el cual constituye una entidad clínicamente heterogénea dentro de la cual existe un grupo de alto riesgo de progresión a MM sintomático (MMQ-AR). El estándar de tratamiento del MMQ es la abstención hasta progresión a MM sintomático. Nuestro grupo está liderando un ensayo clínico para determinar si el tratamiento con lenalidomida más dexametasona (LenDex) en el MMQ-AR prolonga el tiempo hasta la progresión. Con el

fin de conocer las características biológicas de este grupo único de pacientes hasta el momento no estudiado, se investigará si el perfil genómico y de expresión génica es capaz de predecir la progresión a MM sintomático y la respuesta al tratamiento con LenDex, así como si dicho perfil se modifica en el momento de la progresión. Además, evaluaremos el impacto a nivel genómico de LenDex sobre el microambiente medular.

Por lo tanto, el presente trabajo estudiará en profundidad la biología de la CP de los diferentes estadios evolutivos de las GM. A pesar de que hay trabajos que analizan desde un punto de vista biológico la CP de la GMSI y del MM, la mayoría de ellos utilizan técnicas de baja resolución e incluyen series pequeñas y heterogéneas, con sujetos mal clasificados y casi siempre carentes de pacientes con MMQ.

**La innovación prevista en nuestro trabajo incluye:**

La selección minuciosa de un número amplio de pacientes con GMSI, MMQ y MM correctamente clasificados según los criterios actuales del IMWG. *International Myeloma Working Group*.

La realización por primera vez de un estudio de heterogeneidad clonal de las alteraciones citogenéticas recurrentes más frecuentes en las gammapatías monoclonales mediante HISF, basado en el estudio no de la simple presencia o ausencia de dichas alteraciones, sino en el porcentaje de CP portadoras de una determinada aberración.

La aplicación de tecnologías genómicas de alta resolución hasta ahora no aplicadas al estudio de la patogenia en etapas de las GM, tales como los SNPs arrays de alta resolución (*Affymetrix 6.0*) y los microarrays para GEP (*Affymetrix Human Gene 1.0*).

La realización por primera vez de la caracterización biológica de un subgrupo muy específico de MMQ: el MM quiescente de alto riesgo de progresión a MM sintomático. En este subgrupo se aplicarán las técnicas antes descritas, realizando un estudio de los pacientes en diferentes momentos: al diagnóstico, a la progresión y tras el tratamiento con Lenalidomida y Dexametasona. Además, por primera vez se estudiarán las alteraciones que dicho tratamiento produce sobre el

micromedioambiente medular de estos sujetos.

## **2. OBJETIVOS**

1. Comparar tanto la frecuencia de las anomalías genéticas recurrentes detectadas mediante hibridación *in situ* fluorescente como la proporción de células plasmáticas genéticamente anormales en el MM con la observada en la GMSI y el MMQ.
2. Estudiar las ganancias y las pérdidas de material cromosómico en las diferentes fases evolutivas de las gammapatías monoclonales: GMSI, MMQ y MM sintomático.
3. Estudiar los perfiles de expresión génica de la GMSI, el MMQ y el MM, con el fin de identificar similitudes y diferencias que ayuden a explicar la evolución diferente de las tres entidades.
4. Investigar si los cambios genómicos y de expresión génica observados en un grupo de pacientes con MMQ de alto riesgo incluidos en el ensayo clínico QuiReDex, influyen en su comportamiento clínico.
5. Evaluar el impacto del tratamiento con Len/Dex sobre el perfil de expresión de las células hematopoyéticas de la médula ósea no mielomatosas.



## **Material y Métodos**



## 1. PACIENTES Y MUESTRAS

En cada uno de los capítulos destinados a desarrollar los objetivos de este trabajo se resumen las características clínicas y biológicas de los pacientes estudiados y de las muestras utilizadas.

## 2. MÉTODOS

### 2.1 Purificación de las células plasmáticas

Tanto la realización de la HISF, como los estudios de microarrays se han realizado sobre CP purificadas mediante el separador inmunomagnético AutoMACs (*Miltenyi*).

#### **Reactivos y soluciones**

- Solución de Lisis. Disolver en 800 mL de agua destilada los siguientes componentes:
  - 37,2 mg de EDTA ( $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$ ) (250 g. *MERCK*)
  - 1 g de  $KHCO_3$  (500 g. *MERCK*)
  - 8,29 g de cloruro amónico ( $NH_4Cl$ ) (500 g. *MERCK*)
- PBS (Phosphate Buffered Saline).
- AutoMACS™ Running Buffer: “Bovine Serum Albumin”, EDTA, “Phosphate Buffered Saline”, 0,09% Azide.
- Tinción May-Grunwald/Giemsa.
- Choque hipotónico (*Merck*): cloruro potásico (2,8 g de KCl en 500 mL de  $H_2O$ )
- Fijador Carnoy: 3 partes de metanol absoluto y 1 parte de ácido acético glacial.
- Buffer RLT Plus: 5mL de RLT plus (*Qiagen*) + 50  $\mu$ L de betamercaptoetanol.
- Trizol (*Invitrogen*).

#### **Procedimiento**

1. Homogeneizar la muestra mediante agujas de pequeño calibre para eliminar posibles coágulos.

2. Añadir la solución de lisis hasta completar un volumen aproximado de 10 mL. Mover bien los tubos e incubar en la nevera durante 10-15 min; después centrifugar 10 min a 1.200

r.p.m a 4 °C. Si aún no se han eliminado por completo los hematíes, repetir el mismo procedimiento.

3. Decantar el sobrenadante, añadir PBS hasta completar un volumen aproximado de 10 mL y centrifugar 10 min a 1.200 r.p.m. a 4 °C. Decantar y agregar 1 mL de PBS. Mezclar y recoger una pequeña muestra para contar (100 µL) en un tubo “eppendorff”. Centrifugar de nuevo la muestra 10 min a 1.200 r.p.m. a 4 °C.

4. Contar las células en una cámara de Neubauer.

5. Decantar y resuspender el botón celular obtenido en PBS + BSA al 0,5% y añadir las microbolas magnéticas CD138+ (*Miltenyi*). Si la cantidad de CP iniciales es superior al 20%, añadir 80 µL de buffer y 20 µL de microbolas por cada 10 millones de células. Si la cantidad de CP es inferior al 20%, añadir 90 µL de buffer y 10 µL de microbolas por cada 5 millones de células.

6. Incubar 15 min en la nevera. Posteriormente añadir PBS + BSA al 0,5% hasta completar un volumen aproximado de 10 mL y centrifugar 10 min a 1.200 r.p.m. a 4 °C.

7. Decantar y añadir de 1,5 a 2 mL de PBS + BSA al 0,5% con pipeta Pasteur sobre el botón celular. Pasar la muestra a un tubo cónico homologado de 15 mL (CORNING) dispuesto sobre una gradilla (conservarla siempre en frío, a 4 °C), que contiene 2 tubos más, uno para la recogida de la selección positiva y otro para la selección negativa. La muestra está preparada para ser procesada por el AutoMACS.

8. Colocar la gradilla, configurar el AutoMACS y programar el aparato con las muestras a separar (es posible separar hasta 5 muestras a la vez). Seleccionar el programa POSSELD\* (para poca cantidad de muestra) o POSSEL\_S\*\* (para una cantidad de células óptima) y su lavado correspondiente (RINSE entre distintos pacientes o QRINSE si se hacen 2 separaciones del mismo paciente). Se dejará programado SLEEP para poder apagar el AutoMACS. Al final se obtienen dos fracciones, la selección positiva (0,5 mL con el programa POSSELD y 2 mL con el POSSEL\_S) que es la que contiene las CP (CD138+) y la selección negativa que contiene el resto de células hematopoyéticas.

9. Control de la calidad de la purificación: realizar una extensión en un porta con 150 µL de la fracción positiva mediante la citocentrífuga. Teñir el porta con la tinción May-Grunwald/Giemsa y hacer un recuento al microscopio de las CP en 2-3 campos, con el objetivo de 20 aumentos, para calcular el porcentaje de la pureza de CP.



10. La fracción positiva se dividirá en dos partes, una para realizar la HISF y el resto para congelar los ácidos nucleicos (DNA y RNA).

11. Preparar la muestra para la HISF: a 500 µL de la selección positiva añadir 500 µL de choque a 37 °C e incubar a esta temperatura durante 10 min. Añadir posteriormente 500 µL de fijador. Realizar 7 citocentrífugas de 200 µL cada una. Los portaobjetos sobrantes se congelarán a -20 °C.

12. Centrifugar el resto de la selección positiva en un tubo “eppendorf” de 1,5 mL durante 10-15 min a 12.000 r.p.m. en la cámara de 4 °C. Decantar el sobrenadante y añadir 350 µL de Buffer RLT Plus. Centrifugar igualmente la selección negativa y añadir 1 mL de Trizol. Congelar ambos tubos a -80 °C.

## 2.2. Hibridación *in situ* fluorescente (HISF)

### **Reactivos y soluciones**

- Fijador Carnoy.
- Buffer de amplificación (*Insitu Biotechnologies*®).
- Formamida 50%.
- Solución de contratinción: 70 µL de DAPI (Diamidino-2 phenylindole) en 70 mL de 2 X SSC.
- Vectashield® (*VECTOR*).

### **Procedimiento**

Se analizaron las siguientes regiones cromosómicas mediante sondas comerciales.

- Región 14q32 (*IGH*): LSI *IGH* dual-color, break-apart rearrangement probe (*Abbott Molecular/Vysis*).
- Región 13q14: LSI 13, RB1 13q14 (*Abbott Molecular/Vysis*).
- Región 17p13: LSI p53, 17p13.1 (*Abbott Molecular/Vysis*).
- Región 1p36 1q21: ON 1q21/SRD 1p36 (*Kreatech Diagnostics*).

En las muestras que presentaban un reordenamiento de *IGH* se estudiaron las siguientes traslocaciones con las correspondientes sondas: t(11;14)(q13;q32) “dual-color, dual-fusion

translocation probes, t(4;14)(p16;q32) dual-color, dual-fusion translocation probes y t(14;16)(q32;q23) “dual-color, dual-fusion translocation probes”.

A continuación se revisan brevemente los pasos seguidos en la realización de la HISF.

1. Montar las sondas de la siguiente manera: 7  $\mu$ L de Buffer de amplificación específico para secuencia única (*Insitus Biotechnologies*®); 2  $\mu$ L de agua destilada; 1  $\mu$ L de la sonda que se va a utilizar. Se obtiene una dilución 1/20.

2. Añadir cada sonda a cada portaobjetos, cubrir con un cubreobjetos de 24 x 24 mm ó 24 x 50 mm y sellar con pegamento.

3. Colocar los portaobjetos ya sellados y secos, con el cubreobjetos hacia arriba, en el termociclador Hybrite® con agua destilada. Activar el programa 1 (6 min. a 75 °C y 20 horas a 37 °C).

4. Lavados posthibridación:

- Precalentar el baño a 46 °C. Eliminar el pegamento de sellado y, si es posible, el cubreobjetos sin forzar las células.

- Realizar un lavado con formamida (50 mL de Formamida, 10 mL de 20 X SSC, 40 mL de agua destilada. Previamente se habrá ajustado el pH de esta solución a 7) 5 min al 50% a 46 °C en agitación.

-Realizar un lavado con 2 X SCC 3 min a 46 °C.

- Contratinción: introducir los portaobjetos en un recipiente con la solución de contratinción durante 2-3 min.

- Añadir a cada portaobjetos una gota de Vectashield® y colocar un cubreobjetos (habitualmente de 24 x 50 mm). Posteriormente se sellarán los laterales con esmalte para evitar que se introduzca el aceite de inmersión al analizar los portaobjetos.

### **Análisis**

Para analizar la HISF se utilizó un microscopio epifluorescente con rueda de filtros (DAPI, FITC, TRITC. Se contaron un total de 200 núcleos. El nivel de corte para la identificación de traslocaciones de *IGH* (sondas de “fusion/break-apart”) y ganancias de 1q fue el 10%, mientras que para las alteraciones numéricas fue el 20%, siguiendo las recomendaciones del European Myeloma Network FISH workshop.

### 2.3. Extracción de los ácidos nucleicos

Antes de llevar a cabo la extracción del DNA y del RNA se seleccionaron las muestras candidatas para la realización de los estudios de alteraciones en el número de copias y de expresión génica. En este sentido, se realizó una revisión de los portaobjetos que contenían la selección positiva (CP purificadas). Sólo se consideraron candidatas para los estudios aquellas muestras en las que el proceso de separación fue altamente efectivo, y por lo tanto cuya selección positiva presentaba una pureza de CP superior al 95% en MM y MMQ y al 90% en GMSI.

Una vez seleccionadas las muestras, el siguiente paso fue realizar la extracción de RNA y DNA.

#### **Reactivos y soluciones**

- Etanol al 70%;  $\beta$ -mercaptoetanol 14.3 mol.
- Buffer RW1; Buffer RPE; RNase-free water.
- Cloroformo; Isopropanol; H<sub>2</sub>O DEPC.
- Buffer RLT Plus; Buffer AW1; Buffer AW2.
- Agua destilada.

#### **Procedimientos**

##### Extracción del RNA de la fracción positiva (congelada en RLT)

1. Descongelar en baño maría a 37 °C 10 min y homogenizar el lisado utilizando una jeringa de 0,9 mm de diámetro 5-10 veces.
2. Transferir el lisado a la columna de DNA y centrifugar a 10.000 r.p.m. 30 s.
3. Traspasar el producto obtenido de la centrifugación a un nuevo tubo de 2 mL. Guardar la columna de DNA a 4 °C para su posterior extracción.
4. Añadir 350  $\mu$ L de etanol al 70% y homogeneizar mediante pipeteo. No centrifugar.
5. Transferir el producto a una columna de RNA y centrifugar a 10.000 r.p.m. 15 s. Eliminar el producto de la centrifugación y añadir 700  $\mu$ L de Buffer RW1 a la columna de RNA. Centrifugar a 10.000 r.p.m. 15 s.

7. Eliminar de nuevo el producto de la centrifugación y añadir 500  $\mu\text{L}$  de Buffer RPE a la columna de RNA. Centrifugar a 10.000 r.p.m 15 s. Repetir este paso de la misma manera, reduciendo la centrifugación a 2 min.

8. Tirar de nuevo el producto de la centrifugación, poner la columna en un nuevo tubo de 2 mL limpio y centrifugar a 14.000 r.p.m. (a máxima velocidad) 1 min.

9. Poner la columna de RNA en un nuevo tubo de 1,5 mL y añadir 30-50  $\mu\text{L}$  de "RNase-free water" sobre la membrana de la columna. Incubar a temperatura ambiente 1 min. Centrifugar a 10.000 r.p.m. durante 1 min. Repetir este paso.

#### Extracción del RNA de la fracción negativa (congelada en trizol)

1. Descongelar en baño maría a 37  $^{\circ}\text{C}$  10 min. Homogenizar por pipeteo. Dejar 5 min a temperatura ambiente.

2. Añadir 200  $\mu\text{L}$  de cloroformo. Mover con "vortex" unos segundos. Incubar a temperatura ambiente 2-3 min. Centrifugar a 12.000 r.p.m., 15 min a 4  $^{\circ}\text{C}$ . Después de la centrifugación la muestra se separa en 3 fases: la inferior (roja) contiene las proteínas; la intermedia (blanca) el DNA; y la superior (acuosa) contiene el RNA.

3. Extracción del RNA:

- Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo y añadir 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol. Mezclar e incubar a temperatura ambiente 10 min.

- Centrifugar a 12.000 r.p.m., 10 min a 4  $^{\circ}\text{C}$  y lavar posteriormente el botón celular con 1 mL de etanol al 75%. Mover con vórtex.

- Centrifugar a 11.000 r.p.m., 5 min a 4  $^{\circ}\text{C}$  y eliminar el etanol. Secar el RNA en hielo.

- Añadir 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  DEPC y purificar con las columnas de separación (Qiagen).

#### Purificación del ARN con las columnas de Qiagen

Con este proceso se pretende mejorar la calidad del ARN y asegurar una mejor hibridación sobre los microarrays.

1. Añadir a los 100  $\mu\text{L}$  de la muestra 350  $\mu\text{L}$  de buffer RLT y mover.

2. Echar 250  $\mu\text{L}$  de etanol 100% y mover mediante pipeteo.

3. Añadir los 700  $\mu\text{L}$  resultantes a las columnas de Qiagen y centrifugar durante 15 s a 10.000 r.p.m.

4. Poner las columnas en un tubo nuevo de 2 mL y añadir 500 µL de buffer RPE (hay que añadirle etanol 100% antes de utilizarlo por primera vez) y centrifugar durante 15 s a 10.000 r.p.m.

5. Añadir otros 500 µL del mismo buffer RPE y centrifugar durante 2 min a 10.000 r.p.m.

6. Eliminar el eluido y centrifugar durante 1 min a máxima velocidad para el perfecto secado de las columnas.

7. Añadir a las columnas 50 µL de agua DEPC, incubar durante 1 min y centrifugar 1 min a 10.000 r.p.m. En esta agua queda diluido el ARN.

8. Añadir otros 50 µL a la columna, con una incubación de 1 min. y centrifugar durante 1 min a 10.000 r.p.m. Precipitar con etanol.

#### Cuantificación y control de calidad del ARN

Tras la extracción del ARN, hemos realizado un análisis cuantitativo y cualitativo del ARN mediante el bioanalizador 2100 (*agilent*), con el Kit “RNA 6000 Nano Labchip”.

Para cada muestra el bioanalizador calcula automáticamente la ratio entre las áreas de las bandas ribosomales 28S y 18S, que idealmente deben estar entre 1,8 y 2,1. Este valor puede ser utilizado como un parámetro de la calidad de la muestra. La variación de esta ratio puede indicar degradación parcial de la muestra o contaminación de la misma. En los casos de completa degradación las bandas llegan a desaparecer.

Los picos más diferenciados y de mayor tamaño se corresponden con las fracciones ribosómicas 18S y 28S. La línea entre 29 s y la fracción 18S debe ser prácticamente recta y los picos pequeños corresponden a pequeñas moléculas de RNA.

#### Extracción del ADN de la fracción positiva

1. Descongelar en baño maría a 37 °C 10 min. Añadir 350 µL de Buffer RLT plus y homogenizar el lisado utilizando jeringa de 0,9 mm de diámetro 5-10 veces.

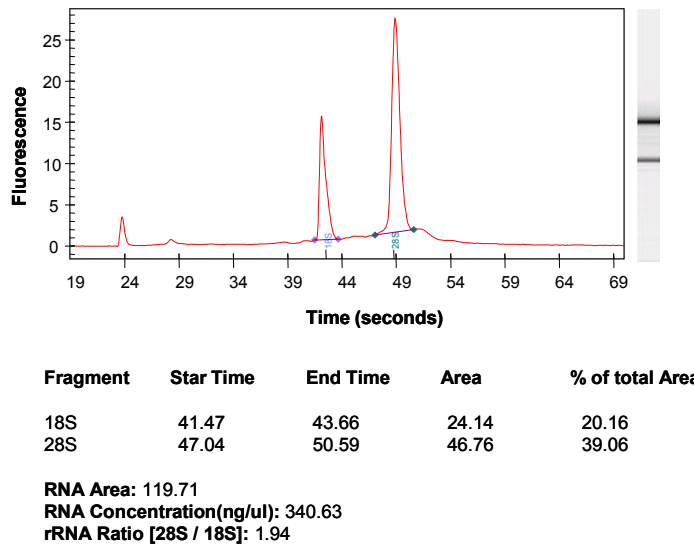
2. Transferir el lisado a la columna de ADN y centrifugar a 10.000 r.p.m. 30 s.

3. Añadir 500 µL de Buffer AW1 y centrifugar a 10.000 r.p.m. 15 s. Desechar el producto obtenido.

4. Añadir 500 µL de Buffer AW2 y centrifugar a 14.000 r.p.m. 2 min. Desechar el producto obtenido.

5. Colocar bajo la columna de ADN un nuevo tubo limpio de 1,5 mL y añadir a la membrana 50-200  $\mu$ L de agua destilada. Incubar 5 min a temperatura ambiente (15-25  $^{\circ}$ C). Centrifugar a 10.000 r.p.m. durante 1 min.

6. Repetir el paso 5.



**Figura 1:** Medida de la cantidad y calidad del ARN mediante el bioanalizador 2100 de Agilent

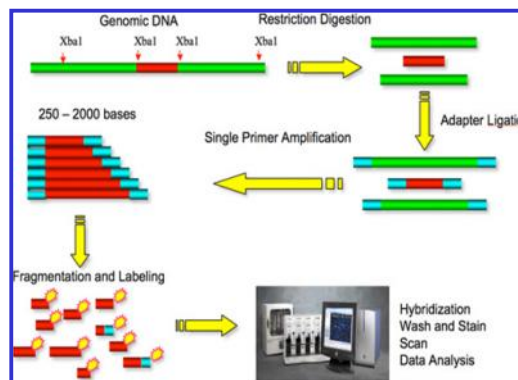
## 2.4 Hibridación del DNA en el array de SNPs.

El ADN se hibridó sobre el array Genome-Wide Human SNP Array 6.0 (Affymetrix) que contiene un total de 1.8 millones de sondas, incluyendo 931.946 SNPs y 946.371 sondas polimórficas para la detección de variación en el número de copias.

### Reactivos y soluciones

- Genome Wide Human SNP 6.0 array (*Affymetrix*).
- Genome Wide Human SNP Nsp/Sty assay kit 5.0/6.0 (30 reaction kit) (*Affymetrix*).
- T4 DNA Ligasa –100000units (*New England Biolabs*).
- NspI –1250 units, New England Biolabs L; Styl –3000 units (*New England Biolabs*).
- Herring Sperm DNA, Promega; Human-Cot1 DNA- 500ul/vial.
- Streptavidine, R-Phycoerytrin conjugate.
- Biotinylated Anti-Streptavidine (*Vector Laboratories*).

- EB Buffer, Qiagen; SNP Clean kit (*Beckman Coulter*).
- 5M NaCl, RNase-free, DNase-free (*Ambion*); MES Hydrate SigmaUltra (*Sigma-Aldrich*).
- MES Sodium Salt (*Sigma-Aldrich*); Denhart's solution (*Sigma-Aldrich*).
- DMSO Ammonium Chloride 5M (*Sigma*); Titanium DNA Amplif. Kit (*Nucliber*).
- Water, Accugene Mol.Biol. Grade, Lonza; EDTA 0.5M pH 8, Ambion.
- 1M tris pH 8 (*Ambion*); 20x SSPE, (*Accugene, Biolabo*).
- Tween 20, 10% (*Pierce Chemical*); TBE 10X; Sodium Hypochlorite (*VWR Scientific*).
- 



- **Procesamiento** (*Fluidics Station 450, GeneChip Scanner 3000 7G and AGCC*)
- **Filtrado** (*Contrast quality control > 0.4 y MAPD < 0.35*)
- **Normalización** (*240 hapmap file*)

**ANÁLISIS** (*Genotyping Console 4.0 –Affymetrix-, dCHIP y ChAS –Affymetrix-, SPSS 15*)

- Criterios** {
1. > 10 marcadores por segmento
  2. > 100 Kb por segmento
  3. <50% de solapamiento con CNV
  4. >5 Mb para las UPD

**Figura 1:** Protocolo de realización del array de SNP: Genome-Wide Human SNP Array 6.0 assay (Affymetrix, Santa Clara, USA)

**Procedimiento**

1. *Preparación de los DNAs genómicos*
  - Preparar cada muestra a una concentración de 50 ng/μL, usando Reduced TE-EDTA buffer.

- Hacer alícuotas de 5  $\mu\text{L}$  de las muestras preparadas en dos series de tubos. Una serie de tubos se empleará para procesar las muestras con la Ez y adaptador NspI y la otra para la Ez y adaptador Styl.

### 2. Digestión del DNA genómico

- Preparar la siguiente mezcla: 11,55  $\mu\text{L}$  de Accugene Water, 2  $\mu\text{L}$  de NE buffer 10x, 0,20  $\mu\text{L}$  de BSA 100x y 1  $\mu\text{L}$  de Nsp I ó Sty I. Mezclar y transferir 14,75  $\mu\text{L}$  a cada muestra.

- Precalentar el termociclador (GeneAmp PCR System 9700) a 37  $^{\circ}\text{C}$  y correr el siguiente programa: 37  $^{\circ}\text{C}$  60 min; 65  $^{\circ}\text{C}$  20 min; 4  $^{\circ}\text{C}$  60 min.

### 3. Ligación del DNA digerido

- Preparar la siguiente mezcla: 0,75  $\mu\text{L}$  de adaptador correspondiente Nsp o Sty, 2,50  $\mu\text{L}$  de T4 DNA Ligasa buffer 10x y 2.00  $\mu\text{L}$  de T4 DNA Ligasa. Mezclar y transferir 5,25  $\mu\text{L}$  a cada muestra.

- Precalentar el termociclador (GeneAmp PCR System 9700) a 16  $^{\circ}\text{C}$  y correr el siguiente programa: 16  $^{\circ}\text{C}$  90 min; 70  $^{\circ}\text{C}$  20 min; 4  $^{\circ}\text{C}$  90 min.

### 4. Dilución del DNA ligado

- Añadir 75  $\mu\text{L}$  de agua Accugene a cada muestra.

### 5. PCR

De cada producto de ligación diluido se prepararán 4 reacciones de PCR para el producto Nsp y 3 para el Sty, además de un control negativo.

- Alicuotar 10  $\mu\text{L}$  de cada ADN diluido en 3 series de tubos.

- Preparar la siguiente mezcla: 39,50  $\mu\text{L}$  de Accugene Water, 10  $\mu\text{L}$  de Titanium Taq PCR buffer 10x, 20  $\mu\text{L}$  de GC Melt 5M, 14  $\mu\text{L}$  de dNTP (2,5 mmol cada uno), 4,50  $\mu\text{L}$  de PCR primer 002 100  $\mu\text{mol}$  y 2  $\mu\text{L}$  de Titanium Taq DNA polimerasa 50x. Mezclar y transferir 90  $\mu\text{L}$  a cada muestra.

- Precalentar el termociclador (GeneAmp PCR System 9700) a 94  $^{\circ}\text{C}$  y correr el siguiente programa: 94  $^{\circ}\text{C}$  3 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s; 60  $^{\circ}\text{C}$  15 s; 68  $^{\circ}\text{C}$  15 s; 68  $^{\circ}\text{C}$  7 min.

### 6. Purificación de los productos de PCR

- Mezclar en un tubo eppendorf de 2 mL los 7 productos de PCR de cada muestra.

- Mezclar vigorosamente las bolas magnéticas hasta que la mezcla sea homogénea.

- Añadir 1 mL de bolas magnéticas a cada "pool" de cada muestra.

- Mezclar por inversión 10 veces e incubar a temperatura ambiente 10 min.



- Centrifugar 3 min a 13.200 r.p.m.
- Poner los tubos en el soporte magnético y descargar el sobrenadante por pipeteo.
- Añadir 1,5 mL de etanol? al 75% a cada tubo. "Vortex" al 75% 2 min.
- Centrifugar 3 min a 13.200 r.p.m.
- Poner los tubos en el soporte magnético y descargar el sobrenadante por pipeteo.
- "Spin" 30 s. Poner los tubos en el soporte magnético y descargar las gotas de etanol por pipeteo.
- Dejar los tubos destapados 15 min a temperatura ambiente.
- Añadir 55 mL de buffer EB a cada tubo. "Vortex" al 75% 10 min.
- Centrifugar 5 min a 13.200 r.p.m. Poner los tubos en el soporte magnético 5 min.
- Transferir 47  $\mu$ L de cada muestra eluída a los correspondientes pocillos de una tira de tubos.

7. *Cuantificación y normalización de los productos purificados mediante el espectrofotómetro Nanodrop.*

#### 8. *Fragmentación*

- Preparar la siguiente mezcla: 34  $\mu$ L de "Accugene Water", 4  $\mu$ L de "buffer" de fragmentación 10x y 2  $\mu$ L de reactivo de fragmentación 2U/  $\mu$ L.
- Añadir 5  $\mu$ L de "buffer" de fragmentación 10x a los 45  $\mu$ L de cada muestra.
- Añadir 5  $\mu$ L de la mezcla antes preparada a cada muestra.
- Precalentar el termociclador (*iCycler, Biorad*) a 37 °C y correr el siguiente programa: 37 °C 35 min; 95 °C 15 min; 4 °C indefinidamente.

#### 9. *Marcaje*

- Preparar la siguiente mezcla: 14  $\mu$ L de "TdT buffer" 5x, 2  $\mu$ L de "GeneChip ADN Labelling Reagent" 30mM y 3,5  $\mu$ L de TdT 30U/ $\mu$ L. Mezclar y transferir 19,5  $\mu$ L a cada muestra.
- Precalentar el termociclador (*iCycler, Biorad*) a 37 °C y correr el siguiente programa: 37 °C 4 horas; 95 °C 15 min, 4 °C indefinidamente.

#### 10. *Hibridación del array*

- Pasar 70  $\mu$ L de las muestras marcadas a tubos "eppendorfs".
- Sacar los arrays a temperatura ambiente una hora antes.

- Preparar la siguiente mezcla: 12  $\mu\text{L}$  de MES 12X, 13  $\mu\text{L}$  de "Denhardt's solution" 50x, 3  $\mu\text{L}$  de EDTA 0.5M, 3  $\mu\text{L}$  de "Herring sperm" DNA, 2  $\mu\text{L}$  de OCR 100, 3  $\mu\text{L}$  de "Human Cot-1" ADN (1mg/mL), 1  $\mu\text{L}$  de "Tween" 20, 3%, 13  $\mu\text{L}$  de DMSO 100% y 140  $\mu\text{L}$  de TMACL 5M. Mezclar y transferir 190  $\mu\text{L}$  a cada muestra.

- Incubar la sonda 10 min a 95  $^{\circ}\text{C}$ . Incubar la sonda 1 min a 49  $^{\circ}\text{C}$ .
- Cargar los arrays con 200 $\mu\text{L}$  de la sonda.
- Dejar 16-18 horas a 60 r.p.m. a 50  $^{\circ}\text{C}$  en el horno de hibridación de Affymetrix.

#### 11. Lavado posthibridación y escaneado

- Retirar la solución de hibridación de los arrays y guardar a -80  $^{\circ}\text{C}$ . Inyectar en el array 300  $\mu\text{L}$  de "array holding buffer".

- Preparar las soluciones de tinción: "Stain buffer", 800,04  $\mu\text{L}$  de Agua Accugene, 360.00  $\mu\text{L}$  de SSPE 20x, 3.96  $\mu\text{L}$  de Tween 20 3% y 24.00  $\mu\text{L}$  de "Denhardt's" 50x.

Mezclar.

- SAPE Solution mix (tubo 1): 594  $\mu\text{L}$  de "Stain buffer" y 6  $\mu\text{L}$  de "Streptavidin Phycoerytrin" 1mg/mL.

- "Antibody Solution mix" (tubo 2): 594  $\mu\text{L}$  de "Stain buffer" y 6  $\mu\text{L}$  de anticuerpo biotinilado 0,5mg/mL.

- Trasvasar 820  $\mu\text{L}$  de array holding buffer a un tubo "ependorf" ámbar (tubo 3).

- Colocar los arrays y las tres soluciones en la "Fluidics Station" y desarrollar el protocolo de lavado correspondiente al array "Genome-wide Human SNP Array 6.0".

- Una vez finalizado el lavado se escanear los arrays utilizando el "GeneChip Scanner 3000".

#### **Control de calidad**

- Una vez realizadas las PCRs se realiza una electroforesis en gel de agarosa al 1% para verificar que ha tenido lugar la amplificación. En dicha electroforesis los productos obtenidos deben tener un tamaño de 200-1.100 pb.

- En la cuantificación de los productos de PCR purificados se deben obtener aproximadamente 200  $\mu\text{g}$  para todas y cada una de las muestras.

- Tras la fragmentación de los productos normalizados se realiza una electroforesis en gel de agarosa al 1% para verificar que este paso ha resultado satisfactorio. En esta electroforesis deben observarse fragmentos menores de 180 pb.

- Posteriormente al scaneado se generan automáticamente los ficheros .cel y .dat en el software AGCC de Affymetrix, y con el uso del software GTC de Affymetrix se generan los ficheros .gqc y .cnchp.

### **Análisis**

Los datos obtenidos se procesan mediante la consola AGCC (Affymetrix GeneChip Command Console Software). Este “software” está disponible para su descarga de forma gratuita en [www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com). Para la instalación del programa se requiere un sistema operativo en el ordenador de 64-bit. Asimismo, para poder procesar los archivos .cel es necesario descargar previamente las Librerías y los Annotation Files de la página web de Affymetrix (NetAffx).

Se generó un “área de trabajo”, donde se incluyeron los archivos .cel de cada uno de los pacientes, junto con los archivos .cel de 10 muestras de DNA normal pareadas. Posteriormente se evaluó la calidad de los archivos .cel para seleccionar aquellos que eran válidos para el análisis de genotipado. Para ello el parámetro recomendado por el Genome-Wide SNP Array 6.0 in Genotyping Console es el “Contrast QC”, que debe ser mayor de 0.4 en cada muestra. Se trata de una medida que captura la habilidad de un experimento para clasificar de forma correcta señales de SNP y utiliza 10.000 random SNP 6.0 SNPs. Todas las muestras utilizadas cumplían este requisito.

Como carecíamos de ADN normal pareado para todos los casos analizados, el análisis se realizó utilizando como modelo de referencia los 240 Hapmap files. Adicionalmente, se ha llevado a cabo el análisis pareado de los 10 pacientes en los que se disponía de DNA tumoral y normal. En nuestro caso, y dado que el modelo de referencia utilizado no se ha generado en el mismo laboratorio y con los mismos lotes que las muestras del estudio, ha sido necesario corroborar que el valor de MAPD (parámetro definido como la Mediana de los valores Absolutos de todas las Diferencias Pareadas entre log<sub>2</sub> ratios, que estima la variabilidad de forma semejante a la desviación estándar) en todos los casos fuera inferior a 0,35.

Las alteraciones en el número de copias reportadas por la consola se han ajustado a los siguientes criterios predefinidos:

- Número mínimo de marcadores por segmento: 10.
- Tamaño genómico mínimo: 100 Kb.
- Porcentaje de solapamiento con alteraciones en el número de copias conocidas y descritas en la población sana (basándose en la “Toronto CNV database”): 50%.

En cuanto al análisis de pérdida de heterocigosidad, las disomías uniparentales (UPD) se definieron como LOH con contenido de DNA diploide y las trisomías uniparentales como LOH en regiones ganadas o amplificadas. Sólo se han considerado las UPD-UPT mayores de 5 Mb para considerar sólo aquellas que son más probablemente adquiridas durante la tumorigénesis.

Los datos de ganancias y pérdidas de material cromosómico, así como los datos de pérdida de heterocigosidad obtenidos tras el procesamiento de los .cel por la Genotyping Console 4.0 de Affymetrix, se han analizado mediante inspección visual cuidadosa por dos observadores con el programa Chromosome Analysis Suite (ChAS).

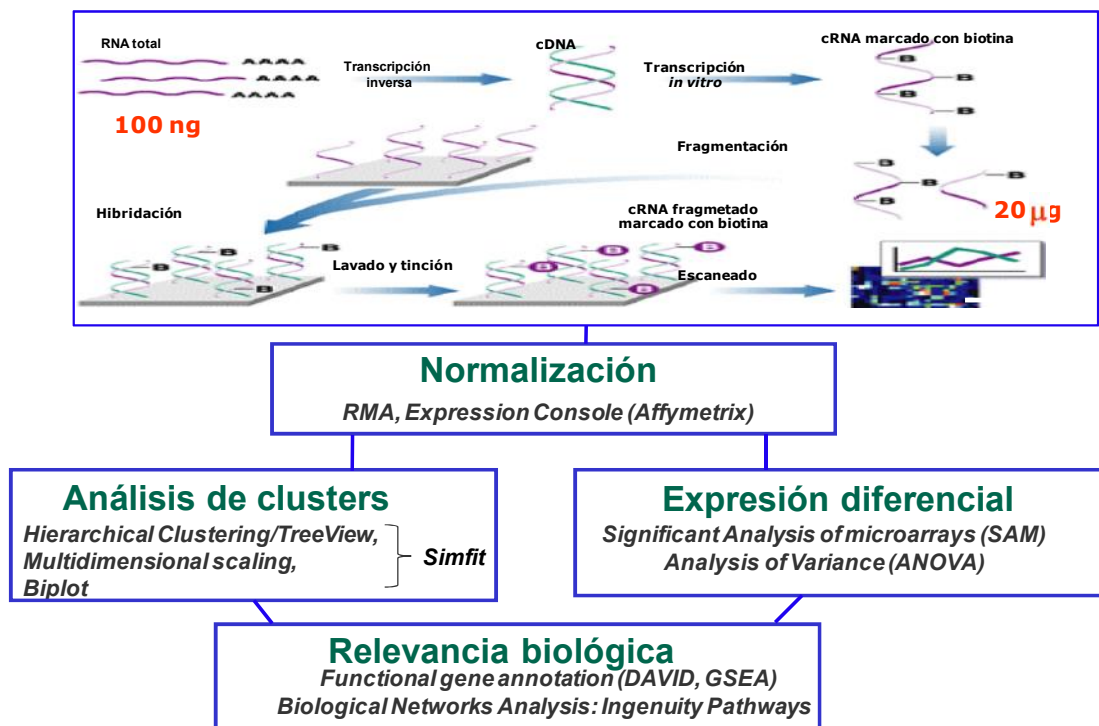
## **2.5 Hibridación del RNA en el “array” de expresión**

El RNA se hibridó sobre arrays Human Gene 1.0 (*Affymetrix*) que contiene aproximadamente 764.885 sondas que identifican 28.869 genes anotados.

### ***Reactivos y soluciones***

- WT Sense Target labelling and control reagents kit (*Affymetrix*).
- TBE 10X (se compra en la unidad de lavado y esterilización).
- Etanol absoluto; Etanol 80%.
- Acetato Sódico 3M (*Sigma-Aldrich*).
- Bromuro de Etidido (*Sigma-Aldrich*).
- DEPC Treated Water (*Ambion*).
- Seroalbúmina bovina, 50 mg/mL, Invitrogen Life Technologies, P/N 15561-020.
- Herring Sperm DNA, Promega, P/N D1811 (Comercial).
- MES hydrate SigmaUltra, Sigma-Aldrich, P/N M5879 (Comercial).

- Wash A; Wash B.
- Array holding buffer: 4150 microl MES 12X + 9250 microl Tween-20 10% + 36550 microl agua Accugene.
- Surfact-Amps 20 (Tween-20), 10% (*Pierce Chemical*).
- R-Phycoerythrin Streptavidin (*Moecular Probes*).
- PBS, pH 7,2 (*Invitrogen Life Technologies*).
- Goat IgG, Reagent Grade (*Sigma-Aldrich*).
- Abtu-streptavidin antibody (goat), biotinylated (*Vector Laboratories*).
- Sodium Hypochlorite, (*VWE Scientific*).



**Figura 2:** Protocolo de realización de array de expresión: GeneChip® Human Gene 1.0 (Affymetrix, Santa Clara, USA)

### Procedimiento

#### 1. Preparación de las diluciones de controles POLY-A

- Preparar diluciones de los controles Poly-A en función de la cantidad de RNA total de partida siguiendo las recomendaciones de la casa comercial ("WT Sense Target labelling and control reagents kit", Affymetrix P/N 900652).

#### 2. Preparación del primer T7 (N)6 /Controles Poly-A

- Preparar una dilución fresca del primer T7 (N)6 de la siguiente manera: 2 µL de Primer T7 (N)6, 2,5 µg/ µL, 6 µL de Dilución Controles Poly-A y 12 µL de Agua RNase-free. Mezclar y dar un "spin" breve. Poner en hielo.

#### 3. Preparación de RNA total/primer T7 (N)6/controles Poly A

- Mezclar el RNA total con la preparación de primer T7 (N)6/controles Poly-A: volumen variable de RNA total, 100-300 ng, 2 µL de Primer T7 (N)6/controles Poly A y volumen variable hasta 5 µL de Agua RNase free.

- Mezclar y dar un "spin" breve. Incubar 5 min. a 70 °C. Enfriar al menos 2 min a 4 °C y dar un "spin". Dejar en hielo hasta continuar con el paso siguiente.

#### 4. Síntesis del cDNA (1<sup>er</sup> ciclo)

- Preparar la siguiente mezcla: 2 µL de 5X "First Strand Buffer", 1 µL de DTT 0.1 M, 0.5 µL de dNTP Mix 10mM y 1 µL de "SuperScript".

- Mezclar y añadir 5 µL al tubo con el ARN total/Primer T7/(N)6/controles Poly-A. Mezclar, dar un spin breve e incubar en un termociclador según el siguiente protocolo (programa Gene 1): 25 °C 10 min.; 42 °C 60 min.; 70° 10 min.

- Enfriar al menos 2 min. a 4 °C y continuar inmediatamente con el siguiente paso.

- Preparar la siguiente mezcla: 4.8 µL de Agua RNase-free, 4.0 µL de MgCl<sub>2</sub>, 0.4 µL de 17.5 mM dNTP Mix, 10 mM, 0.6 µL de E.Coli DNA polymerase y 0.2 µL de RNase H

- Mezclar y añadir 10 µL al tubo anterior. Mezclar, dar un "spin" breve e incubar en un termociclador según el siguiente protocolo (programa Gene 2): 16 °C 120 min (sin calentamiento de la tapa) y 75 °C 10 min (con calentamiento de la tapa).

- Enfriar al menos 2 min a 4°C y continuar con el siguiente paso.

#### 5. Síntesis y limpieza del crRNA (1<sup>er</sup> ciclo)

- Mezclar en un tubo "eppendorf" a temperatura ambiente: 5 µL de 10X IVT "Buffer", 20 µL de IVT NTP Mix y 5 µL de IVT Enzyme Mix.

- Mezclar y transferir 30  $\mu\text{L}$  a la muestra resultante del paso anterior. Mezclar, dar un "spin" breve e incubar en un termociclador según el siguiente protocolo (programa "Gene" 3): 37  $^{\circ}\text{C}$  16 horas y 4  $^{\circ}\text{C}$  indefinido.

- Proceder a la purificación del cRNA con las columnas de Affymetrix según recomendaciones de la casa comercial.

- Cuantificar el cRNA obtenido mediante el espectrofotómetro. La cantidad de cRNA obtenida depende del tipo de tejido de procedencia.

#### 6. Síntesis del cDNA (2º ciclo)

- Mezclar en un tubo el cRNA resultante del paso anterior con los "random primers" de la siguiente manera: volumen variable de cRNA 10, 1.5  $\mu\text{L}$  de "random primers" (3  $\mu\text{g}$  /  $\mu\text{L}$ ) y volumen variable hasta completar 8  $\mu\text{L}$  de agua "RNase-free".

- Mezclar, dar un "spin" breve e incubar en un termociclador según el siguiente protocolo (programa "gene" 4): 70  $^{\circ}\text{C}$  5 min y 25  $^{\circ}\text{C}$  5 min.

- Enfriar a 4  $^{\circ}\text{C}$  al menos 2 min.

- Preparar la siguiente mezcla: 4  $\mu\text{L}$  5X "First Strand Buffer", 2  $\mu\text{L}$  de DTT, 0,1 M, 1,25  $\mu\text{L}$  de dNTP+dUTP 10 mM y 4,75  $\mu\text{L}$  de "SuperScript".

- Mezclar y transferir 12  $\mu\text{L}$  a cada muestra. Mezclar dar un "spin" breve e incubar en un termociclador según el siguiente protocolo (programa "Gene" 5): 25  $^{\circ}\text{C}$  10 min, 42  $^{\circ}\text{C}$  90 min, 70  $^{\circ}\text{C}$  10 min, 4  $^{\circ}\text{C}$  al menos 2 min.

#### 7. Hidrólisis y limpieza del DNA de cadena simple

- Añadir 1  $\mu\text{L}$  de RNasa H a cada muestra e incubar en un termociclador según el siguiente protocolo (programa "Gene" 6): 37  $^{\circ}\text{C}$  45 min, 95  $^{\circ}\text{C}$  5 min, 4  $^{\circ}\text{C}$  2 min.

- Proceder a la purificación del DNA con las columnas de Affymetrix según recomendaciones de la casa comercial.

- Cuantificar el ADN obtenido mediante el espectrofotómetro. Si el proceso ha sido correcto debe haber > 5,5  $\mu\text{g}$  de DNA de cadena simple por muestra.

#### 8. Fragmentación del DNA de cadena simple

- Preparar en un tubo el ADN resultante del paso anterior de la siguiente manera: 5,5  $\mu\text{g}$  de DNA de cadena simple y volumen variable hasta completar 31,2  $\mu\text{L}$  de "Agua RNase free".

- Preparar la siguiente mezcla: 10  $\mu\text{L}$  de Agua RNase free, 4.8  $\mu\text{L}$  de 10XcDNA fragmentation buffer, 1.0  $\mu\text{L}$  de UDG, 10U/  $\mu\text{L}$  y 1.0  $\mu\text{L}$  de APE 1, 1000 U/  $\mu\text{L}$ .
- Mezclar y transferir 16.8  $\mu\text{L}$  a cada muestra. Mezclar dar un “spin” breve e incubar en un termociclador según el siguiente protocolo (programa Gene 7): 37  $^{\circ}\text{C}$  60 min; 93  $^{\circ}\text{C}$  2 min; 4  $^{\circ}\text{C}$  al menos 2 min.
- Mezclar, centrifugar y transferir 45  $\mu\text{L}$  a un nuevo tubo de 1.5 mL. Analizar el material restante mediante el bionalizador de Agilent. Si el proceso ha sido correcto, el ADN fragmentado debe mostrar la mayoría de los fragmentos entre 40 y 70 bases.

#### *9. Marcaje del ADN fragmentado*

- Preparar la siguiente mezcla: 12  $\mu\text{L}$  de 5X TdT Buffer, 2  $\mu\text{L}$  de TdT, 30 U/  $\mu\text{L}$  y 1  $\mu\text{L}$  de DNA labeling Reagent, 5mM.
- Mezclar y transferir 15  $\mu\text{L}$  a cada muestra.
- Incubar en bloques térmicos siguiendo el siguiente patrón: 37  $^{\circ}\text{C}$  60 min; 70  $^{\circ}\text{C}$  10 min. Enfriar en hielo 2-10 min.

#### *10. Hibridación del array*

- Sacar los arrays “Human Gene 1.0” a temperatura ambiente una hora antes.
- Mezclar en tubo “ependorf”: DNA fragmentado marcado (27  $\mu\text{L}$ ), Control oligonucleotide B2 (1,7  $\mu\text{L}$ ), 20X Eukaryotic Hybridization Controls (5  $\mu\text{L}$ ), Herring sperm DNA (1.0  $\mu\text{L}$ ), Acetylated BSA (1.0  $\mu\text{L}$ ), 2X Hybridization Buffer (50  $\mu\text{L}$ ), DMSO (7  $\mu\text{L}$ ) y Agua RNase-free (volumen variable hasta 100  $\mu\text{L}$ ).
- Incubar la mezcla anterior 5 min a 99 $^{\circ}$  y 5 min a 45  $^{\circ}\text{C}$ .
- Centrifugar 1 min a máxima velocidad.
- Inyectar 80  $\mu\text{L}$  de la solución de hibridación en el array correspondiente.
- Dejar 17-18 horas a 60 r.p.m. a 45  $^{\circ}\text{C}$  en el horno de hibridación de Affymetrix.

#### *11. Lavados posthibridación y escaneado*

- Una vez transcurridas las 17-18 horas de hibridación, retirar la solución de hibridación de los arrays y guardar a -80  $^{\circ}\text{C}$ . Inyectar en el array 100  $\mu\text{L}$  de Wash A.
- Preparación de las soluciones de tinción:
  - SAPE solution (Tubo 1): 600  $\mu\text{L}$  de 2X Stain Buffer, 540  $\mu\text{L}$  de Agua, 48  $\mu\text{L}$  de BSA y 12  $\mu\text{L}$  de SAPE.



- Antibody solution (tubo 2): 300  $\mu$ L de 2X Stain Buffer, 266, 4  $\mu$ L de Agua, 24  $\mu$ L de BSA, 6  $\mu$ L de Goat Ig G y 3.6  $\mu$ L de anticuerpo biotinilado.
- 800  $\mu$ L de array holding buffer (tubo 3).
- Colocar los arrays y las 3 soluciones de tinción en la Fluidics Station y desarrollar protocolo de lavado adecuado según el tipo de array.
- Una vez finalizado el lavado se escanearán los arrays utilizando el GeneChip Scanner 3000.

### **Control de calidad**

Existen varios puntos a lo largo del proceso que nos permiten controlar la eficacia del mismo:

1. La cantidad de cRNA obtenida depende del tipo de tejido de procedencia y debe ser acorde con el mismo.
2. La cantidad de DNA ss(+) obtenida debe ser  $>5,5 \mu\text{g}$  por muestra.
3. Análisis del tamaño de los fragmentos resultantes después del proceso de fragmentación mediante el bioanalizador de “Agilent” de forma que la mayoría de los fragmentos deben encontrarse entre 40 y 70 b.
4. Una vez realizado el escaneado del array debe controlarse la correcta disposición de la matriz de puntos.
5. Utilizando el software apropiado para este tipo de arrays (“Expression Console”) se obtiene un informe con los principales parámetros de la hibridación, que deben ser semejantes entre las muestras provenientes del mismo tipo de tejido y organismo.

### **Análisis bioinformático**

El análisis de los datos proporcionados por la hibridación de los microarrays es un proceso complejo ya que se obtienen decenas de miles de números para cada muestra. Por ello, es preciso seguir un protocolo de análisis que consta de los siguientes pasos:

#### *1. Selección de los microarrays con buena calidad de hibridación*

Antes de incluir un chip en un análisis determinado es imprescindible que cumpla los criterios de una hibridación de buena calidad:

- Scaling factor (SF) menor de tres veces, es decir, el SF más elevado no supera en 3 veces al más bajo.

- Proporción entre la señal del extremo 3' de GAPDH y el extremo 5' inferior a 2,5
- Número de sondas presentes en el chip superior al 40%.

## 2. Normalización

Para la normalización de los resultados se ha usado la consola de expresión de Affymetrix, en la que está disponible el algoritmo RMA, resultando una matriz con 99 columnas (muestras) y 33297 filas (sondas).

## 3. Filtrado

En un primer paso se eliminaron todos aquellos genes que han sido reportados previamente como contaminantes. En segundo lugar, se procedió a eliminar todas aquellas sondas de baja intensidad: en nuestro caso utilizamos el criterio de eliminar todas aquellas sondas que en 95 de las 99 muestras tengan una expresión inferior a 6.6 (en log<sub>2</sub>, 100 en expresión absoluta). La tabla de entrada en el filtrado fue el archivo obtenido de la normalización, mientras que el archivo de salida fue una tabla de similares características, pero con un número inferior de filas.

## 4. Análisis no supervisados

Para el análisis no supervisado se utilizó el Escalado Múltiple Dimensional (MDS), implementado en el paquete estadístico SIMFIT (<http://www.simfit.manchester.ac.uk>). MDS es una técnica que representa medidas de similitud entre pares de objetos como distancias entre puntos en un espacio multidimensional de baja dimensión. Esta representación en baja dimensión permite la inspección visual de la estructura de los datos. MDS es una alternativa a los dendrogramas del análisis de clústers. La medida de asociación utilizada fue la distancia Euclídea. Para llevar a cabo el MDS se utilizó el software SIMFIT, que es un programa informático para simulación, ajuste de curvas, análisis estadístico y representación gráfica. Utiliza modelos matemáticos seleccionables de su colección o suministrados por el usuario. Este programa se ejecuta bajo sistemas operativos Win32. En el presente trabajo se utilizó la versión 6.2.9 disponible para la libre descarga en <http://www.simfit.man.ac.uk/>.

## 5. Análisis supervisado.

Para verificar la existencia de diferencias estadísticamente significativas se usó el algoritmo SAM (significant analysis of microarrays) de datos apareados o no apareados según el estudio. Este algoritmo se ha utilizado desde dos programas: i) Un programa de acceso libre que se descarga en la dirección <http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM>. ii) Desde la plataforma R (librería 'siggenes'). En todos los casos sólo se consideraron significativas aquellas sondas que tenían un FDR igual a 0%, es decir, las sondas con un 0% de falsos positivos

Para realizar el análisis SAM se generó un archivo, en que las 2 primeras columnas incluyen el identificador de sonda mientras que en el resto de columnas se incluyeron los datos del nivel de intensidad obtenida para cada sonda y cada muestra de los grupos que se compararon.

Los criterios seleccionados en el algoritmo fueron los definidos 'por defecto' en el programa, basados en la realización de una t de-Student y 1000 permutaciones del algoritmo. De esta manera se generó un archivo-tabla de salida que contenía la siguiente información: identificador del gen, d-value (o score) o marcador del cambio del gen para la comparación realizada, q value (significación estadística del d-value) y el "fold change" o medida del cambio del gen entre los grupos.

## 2.6 Otros métodos: Citometría de flujo multiparamétrica

La citometría de flujo no forma parte de las técnicas cardinales de este trabajo. Tan sólo se ha empleado para discriminar las CP aberrantes de las normales. Por ello no se describirá de forma pormenorizada y únicamente se resumirán los pasos más importantes.

1. Incubar un total de  $2 \times 10^6$  células frescas de MO con un panel de anticuerpos monoclonales (AcMo) diseñado en cuádruples combinaciones: CD38/CD56/CD19/CD45, CD138/CD28/CD33/CD38 y CD20/CD117/CD138/CD38 usando una técnica de inmunofluorescencia directa. Los AcMo empleados deben estar conjugados con uno de los siguientes fluorocromos: isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), tandem PE/cianina 5 (PE/Ci5), pteridil-clorofil-proteína (PerCP) y alofocianina (APC).

2. Además, dado que las CP presentan autofluorescencia de forma natural, incluir en el panel un tubo control negativo, sólo marcado con anti-CD38-PE/Ci5, para establecer el nivel basal de autofluorescencia de las CP en los canales FL-1/FITC, FL-2/PE y FL-4/APC.

3. Adquirir un total de  $2 \times 10^4$  células correspondientes a la celularidad global de la MO en un citómetro de flujo FACSCalibur utilizando el programa CellQUEST (BD Biosciences, San José, CA). Cuando el porcentaje de CP en MO sea menor al 10% realizar un segundo paso de adquisición celular.

4. Seleccionar la información correspondiente a las CP dibujando una ventana electrónica en función del parámetro SSC ("Side Scatter"- complejidad interna) y la reactividad para el antígeno CD38. En este segundo paso seleccionar  $\approx 3 \times 10^3$  CP de entre  $3 \times 10^5$ - $10^6$  células adquiridas del total de las poblaciones presentes en la muestra. Para el análisis inmunofenotípico utilizar el programa Paint-A-Gate-PRO (BD Biosciences). Basándose en la intensidad de expresión para CD38 y CD138 y por las típicas características de dispersión de luz- tamaño celular (FSC, "forward side scatter") y complejidad interna (SSC, "side scatter"), identificar las CP y excluir del análisis otros componentes celulares y células apoptóticas presentes en la muestra. Para evaluar el perfil antigénico de las CP se definirán los siguientes parámetros: (a) presencia o ausencia de expresión antigénica, (b) patrones de expresión antigénica (homogéneos *versus* heterogéneos), (c) porcentaje de CP con expresión positiva para cada antígeno, y (d) cantidad media de antígeno expresada por célula dentro de una población de CP expresada según la intensidad media de fluorescencia (unidades lineales arbitrarias en una escala de 0 a  $10^4$ ).

## 2.7. Análisis estadístico de los resultados

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa estadístico SPSS (SPSS, Chicago, IL). Para evaluar las asociaciones estadísticas entre las variables categóricas se utilizó el test Chi-cuadrado con la corrección de Yates y la prueba exacta de Fisher cuando estaban indicadas.

La comparación de medias entre dos grupos se efectuó con los siguientes tests:

Para muestras independientes se utilizó la prueba de la *t de Student* para datos independientes y el test no paramétrico de la *U de Mann-Whitney* en el caso de no cumplirse las condiciones de normalidad.

Para muestras relacionadas se empleó la prueba de la *t de Student* para datos apareados y el *test de Wilcoxon*, no paramétrico, cuando no se cumplía la hipótesis de normalidad.

La relación entre dos variables cuantitativas continuas se estudió mediante los tests de correlación lineal y de *Spearman*.



## **Resultados**





En este apartado se presentarán las publicaciones a que ha dado origen la presente tesis doctoral como secciones independientes en dos bloques, el primero de ellos compuesto por tres capítulos y el segundo por dos capítulos. Cada capítulo irá precedido de un resumen en castellano (cumpliendo con la normativa de la Universidad de Salamanca) y contendrá tanto la introducción como el material y métodos empleados, los resultados obtenidos y la discusión de dichos resultados.

El primer bloque recoge los estudios realizados dirigidos a profundizar en la etiopatogenia de la transformación en etapas del mieloma múltiple. Incluye los estudios realizados de hibridación *in situ* fluorescente (primer capítulo), de arrays de SNPs (segundo capítulo) y de expresión génica (tercer capítulo).

El segundo bloque recoge los estudios realizados dirigidos a profundizar en la biología de una entidad única: el mieloma múltiple quiescente con alto riesgo de transformación (MMQ-AR). Incluye los análisis sobre la población de células plasmáticas dirigidos a tratar de predecir el riesgo de transformación y probabilidad de respuesta al tratamiento del MMQ-AR, así como el análisis genómico de la célula plasmática en el momento de la transformación (cuarto capítulo) y los análisis sobre la población hematopoyética no tumoral dirigidos a evaluar el impacto del tratamiento sobre el micromedioambiente medular del MMQ-AR (quinto capítulo).

### **BLOQUE 1:**

1. La progresión de gammapatía monoclonal de significado incierto a mieloma quiescente y finalmente a mieloma sintomático conlleva una expansión clonal de las células plasmáticas genéticamente anormales. "The progression from MGUS to smoldering myeloma and eventually to multiple myeloma involves a clonal expansion of genetically abnormal plasma cells". *Clinical Cancer Research*. 2011 Apr 1;17(7):1692-700.

2. Análisis de SNP-arrays revelan una gran complejidad genómica en las gammapatías monoclonales: de la gammapatía monoclonal de significado incierto al mieloma múltiple. "SNP-based mapping arrays reveal high genomic complexity in

monoclonal gammopathies: from the MGUS to MM status". *Leukemia*. 2012 May 8. doi: 10.1038/leu.2012.128. [Epub ahead of print]

3. Análisis del perfil de expresión génica en las gammopatías monoclonales: de la gammapatía monoclonal de significado incierto al mieloma múltiple pasando por el mieloma quiescente. "Global gene expression profiling in the study of the multistep transformation in MM: from MGUS to myeloma status". *Manuscrito en preparación*.

## **BLOQUE 2:**

1. Análisis genómico del Mieloma Múltiple Quiescente de alto riesgo. "Genomic analysis of High Risk Smoldering Multiple Myeloma". *Haematologica* 2012. Feb 13. (Epub ahead of print).

2. El análisis de perfil de expresión génica de las células hematopoyéticas no tumorales de la medula ósea de los pacientes con Mieloma Múltiple Quiescente de alto riesgo no se ve modificado por el tratamiento con Lenalidomida/Dexametasona. "Gene expression profile of normal hematopoietic bone marrow cells from patients with Smoldering Myeloma is not substantially modified by sustained Lenalidomide/Dexamethasone treatment". *Submitted for publication*.

## Capítulo 1:

**The progression from MGUS to smoldering myeloma and eventually to multiple myeloma involves a clonal expansion of genetically abnormal plasma cells.**

L Lopez-Corral, NC Gutierrez, MB Vidriales, MV Mateos, R García-Sanz, B Paiva y JF San Miguel.

*Clin Cancer Res. 2011 Apr 1;17(7):1692-700.*

**La progresión de gammapatía monoclonal de significado incierto a mieloma quiescente y finalmente a mieloma sintomático conlleva una expansión clonal de las células plasmáticas genéticamente anormales.**

**Fundamento:** Las alteraciones genéticas detectadas en el mieloma múltiple (MM) se han descrito también en sus fases premalignas: gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI) y MM quiescente (MMQ). El objetivo fue analizar el nivel de heterogeneidad clonal de las anomalías citogenéticas recurrentes en la GMSI, el MMQ y el MM.

**Métodos:** Se incluyeron en el estudio 373 MM, 102 MMQ de alto riesgo y 90 GMSI de nuevo diagnóstico clasificados por los criterios actuales del Grupo Internacional del MM. Las células plasmáticas (CP) de las muestras de médula ósea se purificaron mediante separación inmunomagnética con microbolas conjugadas con el anticuerpo CD138. Mediante hibridación *in situ* fluorescente (HISF) se evaluaron las translocaciones de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (*IGH*), las deleciones de 13q14 y de 17p13, y las ganancias de 1q21. Por último, se estudió la correlación entre la proporción de CP con alteraciones citogenéticas y el porcentaje de CP clonales identificadas por citometría de flujo (CMF) multiparamétrica en cada muestra.

**Resultados:** Se observaron diferencias significativas entre la proporción de CP clonales con alteraciones citogenéticas específicas en GMSI vs MMQ y en MMQ vs MM. Así, la mediana de la proporción de CP con translocaciones de *IGH* globalmente consideradas, t(11;14) y *del* (13q) fue menor en GMSI vs MMQ, y en MMQ vs MM (translocaciones de *IGH*: 34% vs 57% vs 76%; t(11;14): 38% vs 61% vs 81% y *del* 13q: 37% vs 61% vs 74% en GMSI, MMQ y MM, respectivamente). Para la t(4;14) la diferencia fue significativa en la comparación entre GMSI/MMQ y MM, y para 1q entre GMSI y MMQ/MM. Para descartar que el incremento de CP con alteraciones citogenéticas durante los estadios evolutivos de las gammapatías monoclonales (GM) fuera debido a la dilución de las CP clonales por las CP policlonales, las cuales están presentes en un número mayor en las GMSI, cuantificamos el número de CP fenotípicamente aberrantes y normales en las GMSI mediante CMF y lo correlacionamos con los resultados del análisis de HISF. Se confirmó que <50% de las

CP clonales presentes en las GMSI presentaban la anomalía citogenética. Finalmente analizamos secuencialmente 3 pacientes con GMSI y 5 MMQ que progresaron a MM sintomático, objetivando que 5 de ellos (2 GMSI y 3 MMQ), que ya tenían alteraciones citogenéticas al diagnóstico, mostraron a la progresión un aumento en la proporción de CP con dichas alteraciones (la proporción se dobló en 1 caso, se triplicó en otros 2 y se sextuplicó en otro).

**Conclusiones:** El número de CP clonales que presentan una alteración citogenética específica aumenta de forma significativa en los estadios evolutivos de las GM, mostrando que la progresión de GMSI a MMQ, y finalmente a MM, conlleva una expansión clonal de células genéticamente anormales.

## **TRANSLATIONAL RELEVANCE**

Previous studies have shown that PCs from MGUS and MM have the same cytogenetic abnormalities than MM. We now show in the present study that a major difference among these three entities is the number of PC with genetic abnormalities that increases from MGUS to SMM and to MM. This finding was found for immunoglobulin heavy chain (*IGH*) translocations, 13q and 17p deletions, and 1q gains using fluorescence *in situ* hybridization. We have ruled out using multiparametric flow cytometry the possibility that the increase of PC with genetic abnormalities during the evolving stages of monoclonal gammopathies, was due to dilution of the clonal PC by residual polyclonal PC. Our results confirmed that only a fraction of the clonal PC present in MGUS carried the cytogenetic abnormality. These findings highlight the potential clinical importance of follow-up quantification of the population of PC with genetic abnormalities in the premalignant conditions of MM.

## ABSTRACT

**Purpose:** Genetic aberrations detected in multiple myeloma (MM) have also been reported in the premalignant conditions, monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering MM (SMM). Our aim was to investigate in depth the level of clonal heterogeneity of recurrent genetic abnormalities in these conditions.

**Experimental Design:** Immunoglobulin heavy chain (*IGH*) translocations, 13q14 and 17p13 deletions, and 1q21 gains using fluorescence *in situ* hybridization (FISH) were evaluated in 90 MGUS, 102 high-risk SMM and 373 MM. To this end, we not only purified plasma cells (PC) for the FISH analysis (purity >90%), but subsequently we examined the correlation between the proportion of PC with cytogenetic changes and the number of clonal PC present in the same sample, as measured by multiparametric flow cytometry.

**Results:** We observed a significant difference between the proportion of clonal PC with specific genetic abnormalities in MGUS compared with SMM, and in SMM compared with MM. Thus, the median proportion of PC with *IGH* translocations globally considered, t(11;14) and 13q deletions was significantly lower in MGUS than in SMM, and in SMM than in MM (*IGH* translocations: 34% vs. 57% vs. 76%; t(11;14): 38% vs. 61% vs. 81% and 13q deletion: 37% vs. 61% vs. 74% in MGUS, SMM and MM, respectively). For t(4;14) the difference was significant in the comparison between MGUS/SMM and MM and for 1q between MGUS and SMM/MM. **Conclusions:** This study demonstrates that the progression from MGUS to SMM, and eventually to MM, involves a clonal expansion of genetically abnormal PC.

## INTRODUCTION

Multiple myeloma (MM) is a clonal plasma cell (PC) disorder that remains an incurable disease accounting for approximately 10% of all hematological cancers. Although it was believed that approximately only one-third of newly diagnosed MM patients had a history of previous monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) (1), recent epidemiological studies have demonstrated that MM evolves from a premalignant condition in most, if not all, patients (2, 3). Although smoldering MM (SMM) is also considered to be an asymptomatic precursor of active MM (4, 5), the rate of progression of these two premalignant conditions to symptomatic MM greatly differ. Thus, while MGUS evolves to MM or a related malignancy at a rate of 1% per year (1), the cumulative probability of progression to active MM or amyloidosis in SMM is 10% per year in the first five years (6).

Consistent with the clinical evolution of PC dyscrasias as a progression from premalignant to malignant entities, the current pathogenic models assume that MM develops through a multistep transformation from normal PC to MGUS, which implies PC immortalization and, subsequently, the transformation to active MM, where clonal PC cause end-organ damage (7-10). Several studies indicate that most genetic changes reported in MM are already present in MGUS (11-16). It is intriguing to see that this also applies to those changes associated with poor outcome in MM, such as t(4;14), t(14;16) and 17p deletion, which have also been found in MGUS, but apparently have no prognostic influence (12-15, 17). However, the frequency of the genetic abnormalities in MGUS and SMM compared with in MM is not well established. Two studies have compared these frequencies (12, 14), showing that the incidence of 13q deletion and t(4;14) is lower in MGUS than in MM, with discrepant results for SMM. In addition, Chiecchio *et al* not only found a different incidence of genetic abnormalities, but also a significantly lower proportion of PC carrying 13q deletion in MGUS than in SMM and MM, while they did not detect any variation for *IGH* rearrangements (14). One explanation for this could be that the lower tumor burden of MGUS affects the final PC purity. Another possibility is that the coexistence of clonal and polyclonal PC within the PC (CD138 population) compartment in MGUS may have contributed to the underestimation of genetically abnormal PC (14, 15).



To shed further light on this matter we have investigated in depth the level of clonal heterogeneity of the recurrent genetic abnormalities in a series of 565 patients with monoclonal gammopathies (90 MGUS, 102 SMM and 373 MM). To do so we not only purified PC for the FISH analysis, but subsequently investigated the correlation between the proportion of PC with cytogenetic changes and the number of clonal PC present in the same sample, as assessed by multiparametric flow cytometry (4, 18). We reasoned that if we were able to demonstrate that the frequency of cytogenetic changes even in the clonal population (excluding the polyclonal one) was lower in premalignant entities (MGUS and SMM) than in symptomatic MM, this would indicate a progressive accumulation of the genetically abnormal PC during the multistep evolution of MM. In order to avoid misclassification or overlapping entities we decided to focus on MGUS patients with more than one year of stable follow-up, high-risk SMM and symptomatic MM using well established criteria (4, 6, 19).

## PATIENTS AND METHODS

### Patients

Samples for this study were obtained from patients with MGUS (n=90), high-risk SMM (102) and newly diagnosed MM (n=373), according to the International Myeloma Working Group criteria (19). All patients were studied at diagnosis before any intervention. High-risk SMM was defined as the presence of >10% PC in bone marrow (BM) and a monoclonal component IgG  $\geq$ 3 g/dL, IgA  $\geq$ 2 g/dL or Bence Jones proteinuria  $\geq$ 1 g/24 h together with absence of CRAB (Calcium increase, Renal insufficiency, Anemia, Bone lesions) (6). Patients meeting either but not both of these two criteria were also included in the study if they met the additional criteria of having  $\geq$ 95% phenotypically aberrant PC in the BM PC compartment (aPC/BMPC) and immunoparesis (4).

The study was approved by the research ethics committees of all participating centers and written informed consent was obtained from all patients in accordance with the Helsinki Declaration. The main clinical and laboratory characteristics of these patients are shown in Supplementary Table S1.

<b>Supplementary Table S1: Clinical and biological characteristics of the patients</b>		
<b>Characteristics</b>		<b>All Patients</b>
<b>MGUS (n=90)</b>		
Sex(%)	Male / Female	68 / 32
Age (years)		63 (39-88)
Ig subtype (%)	IgG / IgA	62 / 38
Bone Marrow Plasma Cells (%)		4 (2-9)
<b>SMM (n=102)</b>		
Sex (%)	Male / Female	47 / 53
Age (years)		65 (39-89)
Ig subtype (%)	IgG / IgA / BJ protein	63 / 35 / 2
Bone Marrow Plasma Cells (%)		16 (4-53)
<b>MM (n=373)</b>		
Sex (%)	Male / Female	52 / 48
Age (years)		65 (35-86)
Ig subtype	IgG / IgA / BJ protein	58 / 30 / 12
ISS	I / II / III	32 / 40 / 28
Bone Marrow Plasma Cells (%)		35 (10-99)

Abbreviations: aPC/BMPC, aberrant plasma cells within the bone marrow plasma cells compartment; BJ, Bence Jones; ISS, international staging system.

Values are expressed as median (range).

### Cytogenetic analysis

In all the BM samples CD138-positive PC isolation was carried out using the AutoMACs automated separation system (Miltenyi-Biotec, Auburn, CA, USA). Purity was >95% in all MM and SMM cases, and >90% in MGUS patients. The systematic screening for genomic aberrations in our institution includes interphase fluorescence *in situ* hybridization (FISH) studies for detecting *IGH* rearrangements (LSI *IGH* dual-color, break-apart rearrangement probe; Abbott Molecular/Vysis, Des Plaines, IL, USA), 13q (LSI 13, RB1 13q14) and 17p deletions (LSI p53, 17p13.1) (Abbott Molecular/Vysis) as previously described, and 1q gains (ON 1q21/SRD 1p36, Kreatech Diagnostics, Amsterdam). Those MM samples with *IGH* translocations were explored for t(11;14)(q13;q32), t(4;14)(p16;q32) and t(14;16)(q32;q23) with the corresponding dual-color, dual-fusion translocation probes from Abbott Molecular/Vysis. The interphase FISH procedure has been described previously in detail (20). A total of 200 interphase nuclei were analyzed using the scoring criteria recommended by the manufacturer. The cut-off level for the identification of *IGH* translocations (fusion/break-apart probes) and 1q gains was set at 10% and at 20% for numerical abnormalities, as recommended by the European Myeloma Network (EMN) FISH workshop.

### Immunophenotypic studies and sorting of BMPC

Immunophenotypic analyses were performed using the following monoclonal antibody combinations (FITC/PE/PerCP-Cy5.5/APC) to identify aberrant antigen expression in PCs: CD38/CD56/CD19/CD45, CD38/CD27/CD45/CD28 and  $\beta_2$ microglobulin/CD81/CD38/CD117 (4, 18). For specific cases, additional staining for cytoplasmic Ig light chains was used to determine the polyclonal or monoclonal nature of the PC. The cIg $\kappa$ /cIg $\lambda$  staining was performed in a four-color tube including simultaneous surface staining for CD38 plus either CD45, CD56 or CD19, depending on the type of antigenic aberration. We first identified PCs on the basis of their uniquely bright intensity for CD38 and intermediate side scatter (SSC). Once PCs had been identified, we focused our analysis on the PC compartment, and within it, we discriminated between PCs with normal and aberrant phenotypes corresponding to polyclonal and clonal PCs, respectively, as we previously demonstrated (21-23). The

underexpression of CD19, CD27, CD38, CD45, and/or CD81; overexpression of CD28 and/or CD56 and asynchronous expression of CD117 were used to identify aberrant phenotypes in PCs (21, 24). The following data were recorded for each case: (i) total percentage of PCs among all nucleated BM cells and (ii) percentage of phenotypically aberrant (clonal) plasma cells within the BMPC compartment. We have identified PC based on high CD38 expression and SSC characteristics, that were easily distinguished from B cells precursor (CD38<sup>high</sup> but SSC low) and from monocytes (weaker CD38 and brighter CD45) (25). We want to stress that in previous studies we did not found differences between the CD38/CD138/SSC and the CD38/SSC identification and enumeration PC approaches (26).

In a group of 18 monoclonal gammopathies samples, immunophenotypically aberrant PC and polyclonal PC were sorted using a FACSAria flow cytometer (BD Biosciences) equipped with 3 laser lines and 13 fluorescence detectors, for further FISH analysis. Reanalysis of the sorted immunophenotypically aberrant PC showed a purity above 98% (27).

Statistical analyses was done using SPSS version 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The  $X^2$  and Fisher's exact tests were used to measure associations between genetic abnormalities and other categorical variables. The Wilcoxon rank sum test was used for continuous variables. Values of  $P < 0.05$  were considered to be statistically significant.

## RESULTS

### Frequency of chromosomal abnormalities in the three subgroups of plasma cell dyscrasias

We observed at least one of the chromosomal abnormalities explored by FISH in 43 of the 90 MGUS (48%), 78 of the 102 SMM (76%) and 257 of the 373 MM (69%). These differences were only statistically significant for the comparison between MGUS and either SMM or MM. When we analyzed the frequency of specific chromosomal abnormalities with respect to the type of monoclonal gammopathy, we found that *IGH* translocations globally considered, 13q and 17p deletions were significantly less frequent in MGUS than in both symptomatic MM and SMM, the latter two subgroups of patients having similar frequencies (Table 1). In fact, these three genetic abnormalities were present respectively in 24%, 22% and 1% of MGUS compared with 41%/36%, 42%/40% and 8%/8% of SMM/MM (Table 1). Upon looking for differences between the subtypes of *IGH* translocation, only a borderline difference was found in t(4;14), which was present in 4% of MGUS but in 12% of SMM and 10% of MM ( $p=0.06$ ) (Table 1). The frequency of 1q gains was significantly lower in MGUS (29%) as compared to MM (42%).

<b>Table 1: Frequency of genetic abnormalities in MGUS, SMM and MM patients</b>				
<i>Genetic Abnormalities</i>	<b>MGUS (n=90)</b> Number of patients (%)	<b>SMM (n=102)</b> Number of patients (%)	<b>MM (n=373)</b> Number of patients (%)	<i>p value</i>
<b><i>IgH</i> abnormality</b>	22/90 (24%)	42/102 (41%)	133/373 (36%)	<b><i>P=0.01 (MGUS vs SMM)</i></b> <b><i>P=0.04 (MGUS vs MM)</i></b>
<b>t(11;14)</b>	9/90 (10%)	16/102 (16%)	52/373 (14%)	<b><i>NS</i></b>
<b>t(4;14)</b>	4/90 (4%)	12/102 (12%)	36/373 (10%)	<b><i>NS</i></b>
<b>t(14;16)</b>	2/90 (2%)	5/101 (5%)	9/373 (2%)	<b><i>NS</i></b>
<b>Other</b>	7/90 (8%)	9/102 (9%)	36/373 (10%)	<b><i>NS</i></b>
<b>13q deletion</b>	20/90 (22%)	42/101 (42%)	151/373 (40%)	<b><i>P=0.004 (MGUS vs SMM)</i></b> <b><i>P=0.001 (MGUS vs MM)</i></b>
<b>17p deletion</b>	1/89 (1%)	8/102 (8%)	29/373 (8%)	<b><i>P=0.04 (MGUS vs SMM)</i></b> <b><i>P=0.02 (MGUS vs MM)</i></b>
<b>1q gain</b>	23/79 (29%)	40/98 (41%)	149/358 (42%)	<b><i>P=0.04 (MGUS vs MM)</i></b>

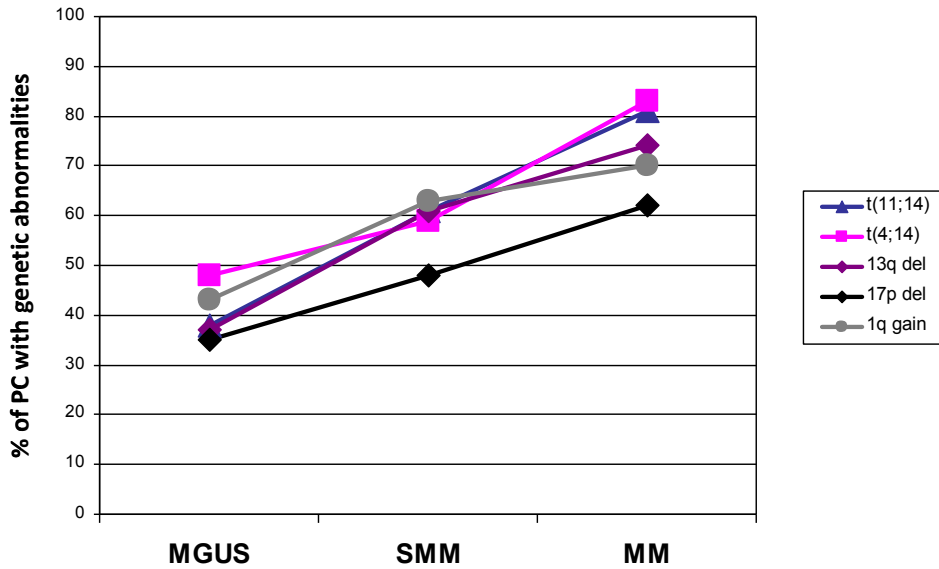
Abbreviations: *NS*, not significant.

### Proportion of PC bearing genetic abnormalities

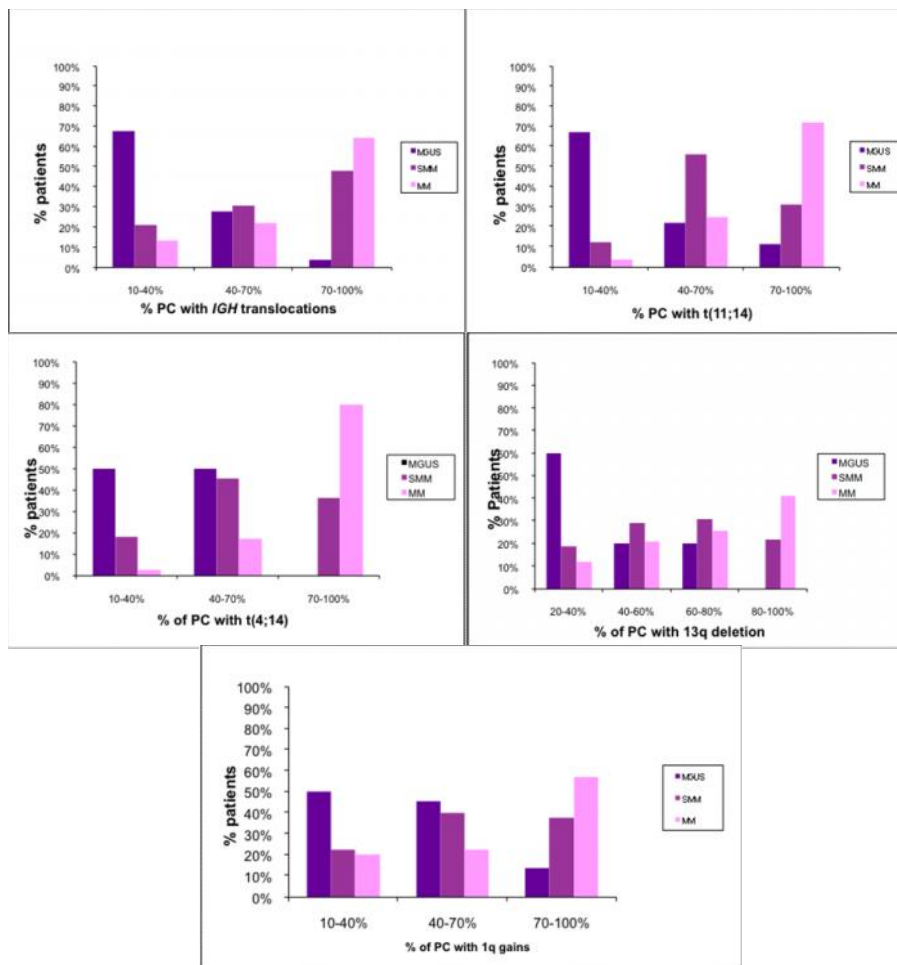
We next wanted to determine not only if there was a difference in the incidence of cytogenetic abnormalities with respect to the underlying diagnosis, but also whether the number of PC with cytogenetic abnormalities varied between MGUS, SMM and MM, for those cases with genetic aberrations. Our results showed that the median proportion of PCs with *IGH* translocations globally considered, t(11;14) and 13q deletions was significantly lower in MGUS than in SMM, and in SMM than in MM status (*IGH*: 34% vs. 57% vs. 76%; t(11;14): 38% vs. 61% vs. 81% and 13q deletion: 37% vs. 61% vs. 74% in MGUS, SMM and MM, respectively) (Table 2). A similar pattern was observed for 17p deletion with median values of 35% vs. 48% vs. 62% in MGUS, SMM and MM, although the differences were not statistically significant. Differences in the proportion of PC exhibiting t(4;14) were also found when comparing MM (83%) with both SMM (59%) and MGUS (48%), although there was no significant difference between MGUS and SMM (Table 2). Furthermore, the median proportion of PC carrying 1q gain was significantly lower in MGUS than in MM (both asymptomatic and symptomatic diseases) (Table 2). Figures 1 and 2 illustrate this gradual change from MGUS to SMM and MM.

<b>Table 2: Percentage of PC with genetic changes in MGUS, SMM and MM patients</b>				
<i>Genetic Abnormalities</i>	<b>MGUS (n=90)</b> Percentage of PC (%) Median (range)	<b>SMM (n=102)</b> Percentage of PC (%) Mediant (range)	<b>MM (n=373)</b> Percentage of PC (%) Median (range)	<i>p value</i>
<b><i>IgH abnormality</i></b>	34 (12-73)	57 (28-90)	76 (11-100)	<i>P</i> <0.001 (MGUS vs SMM) <i>P</i> <0.001 (MGUS vs MM) <i>P</i> =0.007 (SMM vs MM)
<b><i>t(11;14)</i></b>	38 (12-72)	61 (24-88)	81 (13-100)	<i>P</i> =0.042 (MGUS vs SMM) <i>P</i> <0.001 (MGUS vs MM) <i>P</i> =0.003 (SMM vs MM)
<b><i>t(4;14)</i></b>	48 (21-69)	59 (32-88)	83 (35-100)	<i>P</i> =0.008 (MGUS vs MM) <i>P</i> =0.007 (SMM vs MM)
<b><i>t(14;16)</i></b>	30 (25-36)	58 (35-72)	76 (15-91)	NS
<b><i>Other</i></b>	30 (12-55)	72 (38-90)	73 (11-90)	<i>P</i> =0.008 (MGUS vs SMM) <i>P</i> =0.001 (MGUS vs MM) <i>P</i> =0.004 (MGUS vs SMM)
<b><i>13q deletion</i></b>	37 (20-79)	61 (22-93)	74 (20-100)	<i>P</i> <0.001 (MGUS vs MM) <i>P</i> =0.007 (SMM vs MM)
<b><i>17p deletion</i></b>	35 (35-35)	48 (32-100)	62 (20-95)	NS
<b><i>1q gain</i></b>	43 (10-91)	63 (14-94)	70 (11-100)	<i>P</i> =0.03 (MGUS vs SMM) <i>P</i> =0.005 (MGUS vs MM)

Abbreviations: NS, not significant.

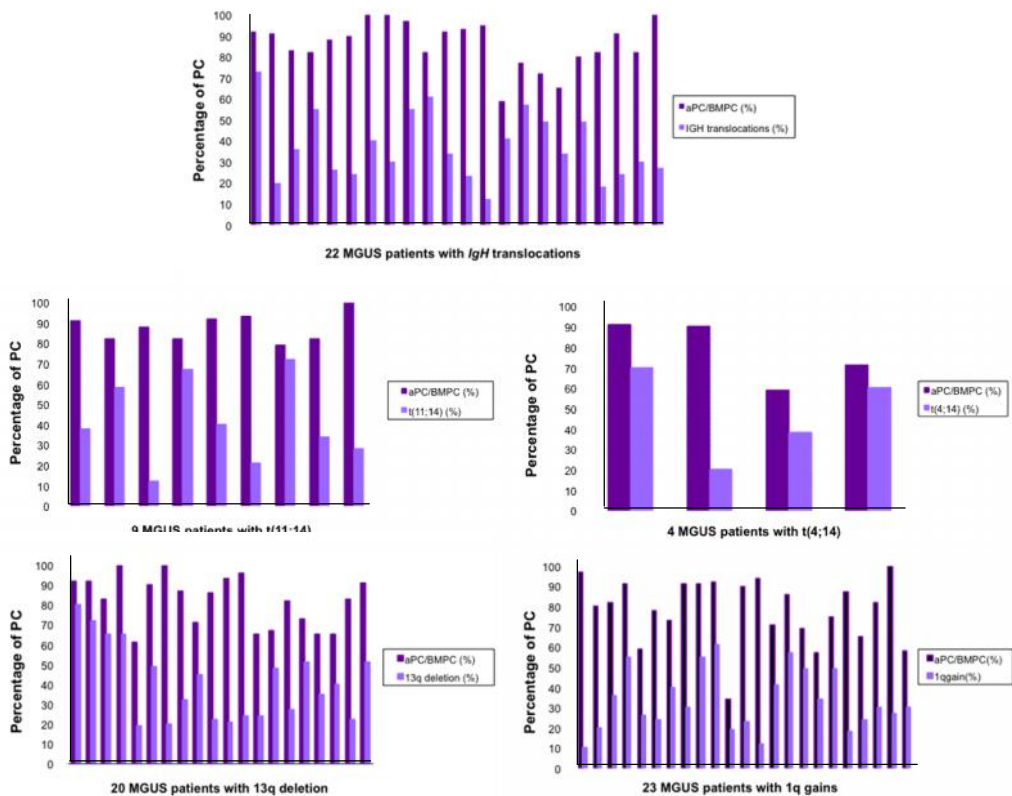


**Figure 1: Median percentage of PC with genetic abnormalities in MGUS, SMM and MM.** The number of PC bearing cytogenetic abnormalities increases from MGUS to SMM and to MM. PC: plasma cells; MGUS: monoclonal gammopathy of undetermined significance; SMM: smoldering multiple myeloma; MM: multiple myeloma.



**Figure 2: Distribution of PC proportions with genetic abnormalities in MGUS, SMM and MM.**

To rule out the possibility that the increase of PC with genetic abnormalities during the evolving stages of monoclonal gammopathies was due to dilution of the clonal PC by residual polyclonal PC, which are present at higher numbers in MGUS than in MM, we used multiparametric flow cytometry to quantify the number of phenotypically aberrant and normal PCs in MGUS and then correlated the results from the FISH analysis with the flow cytometry data. Our results confirmed that only a fraction (<50% in most cases) of the clonal PC present in MGUS carried the cytogenetic abnormality. This was observed for all the chromosomal changes to a greater or lesser extent. Figure 3 illustrates the disparity between the percentage of clonal PC assessed by flow cytometry and the proportion of PC genetically abnormal for the *IGH* rearrangement, t(11;14), t(4;14), 13q deletion and 1q gains. Although there were 14 MGUS cases with more than one chromosomal abnormality, we did not observe a predominant abnormal clone that enabled us to infer that one of the abnormalities was a primary genetic aberration.



**Figure 3: Comparison of proportion of clonal PC by flow cytometry and percentage of PC with chromosomal abnormalities in MGUS patients.** PC: plasma cells; aPC: abnormal plasma cells; BMPC: bone marrow plasma cells.



Since the monoclonal antibody (CD138) used for selecting the PC subsequently analyzed by FISH was not included in the flow cytometry panel and this fact could interfere in the correlation between FISH analysis and flow cytometry results, we performed FISH studies on the clonal PC sorted by flow cytometry in a group of 18 monoclonal gammopathies. Ten of the 18 samples showed cytogenetic lesions and the analysis of the cytogenetically abnormal cases confirmed that only a proportion of clonal PC identified by flow cytometry (purity>98%) displayed the genetic abnormality (Supplementary table S2).

<b>Supplementary Table S2:</b>			
<b>Proportion of clonal PC purified by FC displaying genetic abnormalities in 10 monoclonal gammopathies cases</b>			
<b>Samples</b>	<b>% of clonal PC / % of polyclonal PC</b>	<b>% of cells with genetics abnormalities on purified clonal PC (&gt;98%)</b>	<b>% of cells with genetics abnormalities on purified polyclonal PC (&gt;98%)</b>
<b>1</b>	35% / 65%	31% Other <i>IGH</i> translocation	0%
<b>2</b>	47% / 53%	57% t(14;16)	0%
<b>3</b>	67% / 33%	78% t(11;14)	0%
<b>4</b>	82% / 18%	62% t(11;14)	0%
<b>5</b>	85% / 15%	61% 13q deletion	0%
<b>6</b>	71% / 29%	82% 13q deletion	0%
<b>7</b>	61% / 39%	82% 13q deletion	0%
<b>8</b>	68% / 32%	83% 13q deletion	0%
<b>9</b>	64% / 32%	84% 13q deletion	0%
<b>10</b>	41% / 59%	75% t(11;14)	0%

Finally, we had the opportunity to analyze sequentially three MGUS and five SMM patients who progressed to symptomatic MM. The genetic abnormalities of this set of patients are described in Table 3. The five patients (two MGUS and three SMM) who already had chromosomal abnormalities at diagnosis showed a higher percentage of PC bearing the genetic aberration at the time of transformation into symptomatic MM. The proportion was doubled in one case, trebled in another two, and increased six-fold in one case.

<b>Table 3: List of 8 patients with progression disease</b>				
<b>Disease at diagnosis</b>	<b>% of PC with genetic abnormalities</b>	<b>Disease at progression</b>	<b>% of PC with genetic abnormalities</b>	<b>TTP (months)</b>
<b>1. MGUS</b>	No abnormalities	<b>MM</b>	<i>Rb</i> deletion (68%)	32
<b>2. MGUS</b>	<i>Rb</i> deletion (25%)	<b>MM</b>	<i>Rb</i> deletion (76%)	28
<b>3. MGUS</b>	t(11;14) (12%)	<b>MM</b>	t(11;14) (73%)	38
<b>4. SMM</b>	1q gain (78%)	<b>MM</b>	1q gain (92%)	17
<b>5. SMM</b>	<i>Rb</i> deletion (31%)	<b>MM</b>	<i>Rb</i> deletion (62%)	14
<b>6. SMM</b>	No abnormalities	<b>MM</b>	No abnormalities	17
<b>7. SMM</b>	No abnormalities	<b>MM</b>	No abnormalities	24
<b>8. SMM</b>	17p deletion (24%)	<b>MM</b>	17p deletion (80%)	14

## DISCUSSION

Our results support the hypothesis that the number of genetically abnormal PC increases from MGUS to SMM and to MM. This observation was seen not only in those abnormalities considered secondary events, like 13q deletions, but also in *IGH* translocations, which are supposed to occur early in the disease pathogenesis (28, 29).

The present study shows that chromosomal abnormalities recurrently found in MM are also present in MGUS, including those abnormalities considered to be secondary genetic events, such as 13q and 17p deletions, and 1q gains, and even those associated with poor outcome, such as 17p deletion, t(4;14) and t(14;16). Interestingly, we found seven MGUS patients with genetic abnormalities associated with dismal outcome -four with t(4;14), two with t(14;16) and one with 17p deletion- and none of them have progressed after a median follow-up of 45 months (range: 22-55 months).

Regarding the frequency of chromosomal abnormalities in the three plasma cell dyscrasias, our study revealed a significantly lower frequency of chromosomal changes at MGUS than at SMM and MM stage. In this setting, the incidence of *IGH* translocations globally considered was significantly lower in MGUS than in SMM and MM, which is not consistent with the results of Chiecchio *et al*, who reported the presence of illegitimate *IGH* rearrangements at the same frequency in patients with MGUS as with MM. In keeping with previous reports we observed a similar prevalence of t(11;14) in the three stages (12, 14). However, although differences were not significant, we also observed, like Chiecchio *et al* and Avet-Loiseau *et al*, a lower percentage of PC displaying t(4;14) in MGUS than in MM, for both symptomatic and asymptomatic diseases. Regarding 13q deletion, its frequency progressively increased from MGUS to MM as reported in previous studies (12, 14). Although 17p deletion is a very rarely described abnormality in MGUS (13, 14), it was found in one MGUS case. In the present study, the classical panel of FISH probes was extended to explore chromosome 1 abnormalities. We described 1q gains in 29% of MGUS, a significantly lower proportion than in both active and asymptomatic MM (41% and 42% respectively). This observation is consistent with the findings of Bochtler *et al* (13), but not with Hanamura data that did not detect 1q gains in MGUS (30). The lack of any significant difference between the incidence of genetic abnormalities in SMM and MM

could be due to the fact that the patients with SMM included in this study had a high risk of progression to symptomatic MM.

Recent data suggest that for prognostication in MM, even more important than the presence or absence of a particular cytogenetic abnormality is the number of PC carrying such abnormality (31). Accordingly, this could be also important in the progression from MGUS to SMM and to MM, with a progressive accumulation of PC carrying the chromosomal abnormality (Figures 1 and 2). In this regard, we observed a significant difference between the proportion of PC with genetic abnormalities in MGUS compared with SMM, and in SMM compared with MM. This was observed for *IGH* translocations globally considered, t(11,14) and 13q deletion. In addition, for t(4;14) there was a significant difference between MGUS/SMM and MM and for 1q between MGUS and SMM/MM. Further studies are needed to determine whether the progression from premalignant stages to MM is influenced by the clonal expansion of genetically abnormal PC. Findings supporting evidence for this hypothesis would justify a FISH analysis along the evolution of genetically abnormal MGUS and SMM, not to identify new genetic changes but to quantify the population of genetically abnormal PC. It is important to emphasize that although the SMM analyzed in the present study had a high risk of progressing to MM and, therefore, great biological similarities between the two entities should be expected, the percentage of PC with genetic abnormalities differed markedly between SMM and symptomatic MM. A study analyzing the influence of the proportion of genetically abnormal PC on the risk to progression of high-risk SMM would be of interest. This hypothesis is also supported by the five cases in which we had the opportunity to perform sequential studies during the evolution from both MGUS and SMM into symptomatic MM identifying a marked increase in the proportion of PC with the genetic abnormality.

The lower frequency of some of the abnormalities in MGUS than in MM, as well as the lower proportion of PC with genetic abnormalities could be explained by the low number of PC in MGUS, which would lead to the true incidence of genomic abnormalities being underestimated. The efficiency of immunomagnetic cell selection has enabled the number of PC exhibiting the chromosomal abnormality to be accurately measured. However, the enrichment can be significantly affected when the tumoral population is very small. To avoid the possibility of contamination of the total

cellularity of BM affecting the results, we selected only those MGUS samples in which the final PC recovery was above 90%. Another factor that could play a part in determining the lower proportion of PC with cytogenetic abnormalities in MGUS is the lower percentage of clonal PC (normal and clonal PC coexist in MGUS samples). This possibility was suggested by Chiecchio *et al* in order to explain the lower proportion of PC with 13q abnormality that they observed in MGUS as compared to SMM/MM (14). Therefore, we considered the possibility that the smaller proportion of genetic abnormalities found in MGUS compared to MM simply reflects contamination of the samples with normal PC, which lack chromosomal aberrations. To explore this, we examined the correlation between the proportions of phenotypically abnormal PC and of those with genetic abnormalities. Interestingly, in most MGUS cases, chromosomal abnormalities were present in a relatively low proportion of clonal PC (Figure 3). On the other hand, the smaller percentage of PC with genetic abnormalities observed in SMM compared with MM also implies that the results are not affected by technical limitations, since the contamination by normal PC in high-risk SMM is very small and comparable to overt MM. This demonstrates for the first time that the progressive increase in the proportion of PC with genetic abnormalities in the subsequent steps from MGUS to MM is a genuine effect that cannot be attributed to the underestimation of genetically abnormal PC in MGUS.

To summarize, our results show that the progression from MGUS to SMM, and eventually to MM, involves a clonal expansion of genetically abnormal PC. One explanation for this is that cytogenetic abnormalities all arise as secondary events, occurring early on disease pathogenesis but not at the very beginning (15), similarly to what has been proposed for chronic myeloid leukemia (32-34). In a further step, these abnormalities would confer a proliferative advantage leading to a clonal selection (an enrichment in PC with genetic abnormalities).

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We are grateful to “Grupo Español de Mieloma” clinicians for providing MM samples; and to I. Isidro, T. Prieto, and V. Gutiérrez for technical assistance.

## REFERENCES

- 1 Kyle, R.A., Therneau, T.M., Rajkumar, S.V., Offord, J.R., Larson, D.R., Plevak, M.F. and Melton, L.J., III A Long-Term Study of Prognosis in Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *N Engl J Med*, 346: 564-569, 2002.
- 2 Weiss, B.M., Abadie, J., Verma, P., Howard, R.S. and Kuehl, W.M. A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients. *Blood*, 113: 5418-5422, 2009.
- 3 Landgren, O. and Weiss, B.M. Patterns of monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma in various ethnic/racial groups: support for genetic factors in pathogenesis. *Leukemia*, 23: 1691-1697, 2009.
- 4 Perez-Persona, E., Vidriales, M.B., Mateo, G., Garcia-Sanz, R., Mateos, M.V., de Coca, A.G., Galende, J., Martin-Nunez, G., Alonso, J.M., de las Heras, N., Hernandez, J.M., Martin, A., Lopez-Berges, C., Orfao, A. and San Miguel, J.F. New criteria to identify risk of progression in monoclonal gammopathy of uncertain significance and smoldering multiple myeloma based on multiparameter flow cytometry analysis of bone marrow plasma cells. *Blood*, 110: 2586-2592, 2007.
- 5 Kyle, R.A. and Greipp, P.R. Smoldering multiple myeloma. *N.Engl.J.Med.*, 302: 1347-1349, 1980.
- 6 Kyle, R.A., Remstein, E.D., Therneau, T.M., Dispenzieri, A., Kurtin, P.J., Hodnefield, J.M., Larson, D.R., Plevak, M.F., Jelinek, D.F., Fonseca, R., Melton, L.J., III and Rajkumar, S.V. Clinical Course and Prognosis of Smoldering (Asymptomatic) Multiple Myeloma. *N Engl J Med*, 356: 2582-2590, 2007.
- 7 Davies, F.E., Dring, A.M., Li, C., Rawstron, A.C., Shamma, M.A., O'Connor, S.M., Fenton, J.A.L., Hideshima, T., Chauhan, D., Tai, I.T., Robinson, E., Auclair, D., Rees, K., Gonzalez, D., Ashcroft, A.J., Dasgupta, R., Mitsiades, C., Mitsiades, N., Chen, L.B., Wong, W.H., Munshi, N.C., Morgan, G.J. and Anderson, K.C. Insights into the multistep transformation of MGUS to myeloma using microarray expression analysis. *Blood*, 102: 4504-4511, 2003.
- 8 Hallek, M., Leif Bergsagel, P. and Anderson, K.C. Multiple Myeloma: Increasing Evidence for a Multistep Transformation Process. *Blood*, 91: 3-21, 1998.
- 9 Hideshima, T., Bergsagel, P.L., Kuehl, W.M. and Anderson, K.C. Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. *Blood*, 104: 607-618, 2004.
- 10 Kuehl, W.M. and Bergsagel, P.L. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat.Rev.Cancer*, 2: 175-187, 2002.
- 11 Avet-Loiseau, H., Li, J.Y., Morineau, N., Facon, T., Brigaudeau, C., Harousseau, J.L., Grosbois, B. and Bataille, R. Monosomy 13 Is Associated With the Transition of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance to Multiple Myeloma. *Blood*, 94: 2583-2589, 1999.
- 12 Avet-Loiseau, H., Facon, T., Grosbois, B., Magrangeas, F., Rapp, M.J., Harousseau, J.L., Minvielle, S. and Bataille, R. Oncogenesis of multiple myeloma: 14q32 and 13q chromosomal abnormalities are not randomly distributed, but correlate with natural history, immunological features, and clinical presentation. *Blood*, 99: 2185-2191, 2002.

- 13 Bochtler,T., Hegenbart,U., Cremer,F.W., Heiss,C., Benner,A., Hose,D., Moos,M., Bila,J., Bartram,C.R., Ho,A.D., Goldschmidt,H., Jauch,A. and Schonland,S.O. Evaluation of the cytogenetic aberration pattern in amyloid light chain amyloidosis as compared with monoclonal gammopathy of undetermined significance reveals common pathways of karyotypic instability. *Blood*, *111*: 4700-4705, 2008.
- 14 Chiecchio,L., Dagrada,G.P., Ibrahim,A.H., Dachs Cabanas,E., Protheroe,R.K.M., Stockley,D.M., Orchard,K.H., Cross,N.C.P., Harrison,C.J., Ross,F.M. and on behalf of the UK Myeloma Forum Timing of acquisition of deletion 13 in plasma cell dyscrasias is dependent on genetic context. *Haematologica*, *94*: 1708-1713, 2009.
- 15 Fonseca,R., Bailey,R.J., Ahmann,G.J., Rajkumar,S.V., Hoyer,J.D., Lust,A., Kyle,R.A., Gertz,M.A., Greipp,P.R. and Dewald,G.W. Genomic abnormalities in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*, *100*: 1417-1424, 2002.
- 16 Kaufmann,H., Ackermann,J., Baldia,C., Nosslinger,T., Wieser,R., Seidl,S., Sagaster,V., Gisslinger,H., Jager,U., Pfeilstocker,M., Zielinski,C. and Drach,J. Both IGH translocations and chromosome 13q deletions are early events in monoclonal gammopathy of undetermined significance and do not evolve during transition to multiple myeloma. *Leukemia*, *18*: 1879-1882, 2004.
- 17 Fonseca,R., Oken,M.M. and Greipp,P.R. The t(4;14)(p16.3;q32) is strongly associated with chromosome 13 abnormalities in both multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*, *98*: 1271-1272, 2001.
- 18 Ocqueteau,M., Orfao,A., Almeida,J., Blade,J., Gonzalez,M., Garcia-Sanz,R., Lopez-Berges,C., Moro,M.J., Hernandez,J., Escribano,L., Caballero,D., Rozman,M. and San Miguel,J.F. Immunophenotypic characterization of plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance patients. Implications for the differential diagnosis between MGUS and multiple myeloma. *Am.J Pathol.*, *152*: 1655-1665, 1998.
- 19 International Myeloma Working Group Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br.J Haematol.*, *121*: 749-757, 2003.
- 20 Gutierrez,N.C., Castellanos,M.V., Martin,M.L., Mateos,M.V., Hernandez,J.M., Fernandez,M., Carrera,D., Rosinol,L., Ribera,J.M., Ojanguren,J.M., Palomera,L., Gardella,S., Escoda,L., Hernandez-Boluda,J.C., Bello,J.L., de la,R.J., Lahuerta,J.J. and San Miguel,J.F. Prognostic and biological implications of genetic abnormalities in multiple myeloma undergoing autologous stem cell transplantation: t(4;14) is the most relevant adverse prognostic factor, whereas RB deletion as a unique abnormality is not associated with adverse prognosis. *Leukemia*, *21*: 143-150, 2007.
- 21 San Miguel,J.F., Almeida,J., Mateo,G., Blade,J., Lopez-Berges,C., Caballero,D., Hernandez,J., Moro,M.J., Fernandez-Calvo,J., Diaz-Mediavilla,J., Palomera,L. and Orfao,A. Immunophenotypic evaluation of the plasma cell compartment in multiple myeloma: a tool for comparing the efficacy of different treatment strategies and predicting outcome. *Blood*, *99*: 1853-1856, 2002.
- 22 Davies,F.E., Rawstron,A.C., Owen,R.G. and Morgan,G.J. Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma. *Best.Pract.Res. Clin Haematol.*, *15*: 197-222, 2002.
- 23 Almeida,J., Orfao,A., Ocqueteau,M., Mateo,G., Corral,M., Caballero,M.D., Blade,J., Moro,M.J., Hernandez,J. and San Miguel,J.F. High-sensitive immunophenotyping and DNA ploidy studies for the investigation of minimal residual disease in multiple myeloma. *Br.J Haematol.*, *107*: 121-131, 1999.

- 24 Mateo Manzanera, G., San Miguel Izquierdo, J.F. and Orfao de Matos, A. Immunophenotyping of plasma cells in multiple myeloma. *Methods Mol. Med*, 113: 5-24, 2005.
- 25 Rawstron, A.C., Orfao, A., Beksac, M., Bezdicikova, L., Brooimans, R.A., Bumbea, H., Dalva, K., Fuhler, G., Gratama, J., Hose, D., Kovarova, L., Lioznov, M., Mateo, G., Morilla, R., Mylin, A.K., Omede, P., Pellat-Deceunynck, C., Perez, A.M., Petrucci, M., Ruggeri, M., Rymkiewicz, G., Schmitz, A., Schreder, M., Seynaeve, C., Spacek, M., de Tute, R.M., Van, V.E., Weston-Bell, N., Owen, R.G., San Miguel, J.F., Sonneveld, P. and Johnsen, H.E. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica*, 93: 431-438, 2008.
- 26 Paiva, B., Vidrales, M.B., Perez, J.J., Mateo, G., Montalban, M.A., Mateos, M.V., Blade, J., Lahuerta, J.J., Orfao, A. and San Miguel, J.F. Multiparameter flow cytometry quantification of bone marrow plasma cells at diagnosis provides more prognostic information than morphological assessment in myeloma patients. *Haematologica*, 94: 1599-1602, 2009.
- 27 Rasillo, A., Tabernero, M.D., Sanchez, M.L., Perez de, A.M., Martin, A.M., Hernandez, J., Moro, M.J., Fernandez-Calvo, J., Sayagues, J.M., Bortoluci, A., San Miguel, J.F. and Orfao, A. Fluorescence in situ hybridization analysis of aneuploidization patterns in monoclonal gammopathy of undetermined significance versus multiple myeloma and plasma cell leukemia. *Cancer*, 97: 601-609, 2003.
- 28 Bergsagel, P.L. and Kuehl, W.M. Chromosome translocations in multiple myeloma. *Oncogene*, 20: 5611-5622, 2001.
- 29 Chng, W.J., Glebov, O., Bergsagel, P.L. and Kuehl, W.M. Genetic events in the pathogenesis of multiple myeloma. *Best. Pract. Res. Clin. Haematol.*, 20: 571-596, 2007.
- 30 Hanamura, I., Stewart, J.P., Huang, Y., Zhan, F., Santra, M., Sawyer, J.R., Hollmig, K., Zangari, M., Pineda-Roman, M., van Rhee, F., Cavallo, F., Burington, B., Crowley, J., Tricot, G., Barlogie, B. and Shaughnessy, J.D., Jr. Frequent gain of chromosome band 1q21 in plasma-cell dyscrasias detected by fluorescence in situ hybridization: incidence increases from MGUS to relapsed myeloma and is related to prognosis and disease progression following tandem stem-cell transplantation. *Blood*, 108: 1724-1732, 2006.
- 31 Avet-Loiseau, H., Leleu, X., Roussel, M., Mathiot, C., Caillot, D., Hulin, C., Marit, G., Facon, T., Attal, M., Harousseau, J.L., Minvielle, S., Campion, L. and Moreau, P. Deletion of the 17p Chromosomal Region Is Associated with a Very Poor Outcome in Multiple Myeloma Independently of the Type of Treatment. *ASH Annual Meeting Abstracts*, 114: 1817, 2009.
- 32 De, M., V, Milojkovic, D., Khorashad, J.S., Marin, D., Goldman, J.M., Apperley, J.F. and Reid, A.G. Philadelphia-negative clonal hematopoiesis is a significant feature of dasatinib therapy for chronic myeloid leukemia. *Blood*, 110: 3086-3087, 2007.
- 33 Zaccaria, A., Valenti, A.M., Donti, E., Gozzetti, A., Ronconi, S. and Spedicato, F. Persistence of chromosomal abnormalities additional to the Philadelphia chromosome after Philadelphia chromosome disappearance during imatinib therapy for chronic myeloid leukemia. *Haematologica*, 92: 564-565, 2007.
- 34 Donti, E., Zaccaria, A., Bassetti, A., Venti, G., Giannini, B., Prontera, P., Bianchi, E., Valenti, A., Saglio, G. and Liberati, A.M. Occurrence of the same chromosome abnormalities in Ph+ and Ph- cells in chronic myeloid leukaemia. Evidence of a secondary origin of the Ph chromosome?. *Br. J. Haematol.*, 135: 265-266, 2006.





## Capítulo 2:

### **SNP-based mapping arrays reveal high genomic complexity in monoclonal gammopathies: from the MGUS to MM status.**

Lucía López Corral, María Eugenia Sarasquete, Sílvia Beà, Ramón García Sanz, María Victoria Mateos, Luis Antonio Corchete, Eva M. García, Joan Bladé, Albert Oriol, Miguel T. Hernández García, Pilar Giraldo, José Hernández, Marcos González, Jesús María Hernández Rivas, Jesús F. San Miguel, Norma C. Gutiérrez.

***Leukemia. 2012 May 8. doi: 10.1038/leu.2012.128. [Epub ahead of print]***

## **Análisis de SNP-arrays revelan gran complejidad genómica en las gammapatías monoclonales: de la GMSI al MM.**

**Fundamento:** Tanto la GMSI como el MM quiescente (MMQ) se consideran entidades premalignas y asintomáticas con capacidad de evolucionar a MM sintomático. A pesar de su comportamiento clínico radicalmente distinto las 3 entidades comparten la misma célula neoplásica, que es una célula plasmática (CP) clonal y aberrante. La citogenética y la hibridación *in situ* no han conseguido identificar alteraciones características de cada estadio evolutivo. Con el fin de averiguar si las tecnologías genómicas de alta resolución son capaces de establecer diferencias y desentrañar nuevos mecanismos patogénicos en la historia natural de progresión en etapas de las gammapatías monoclonales (GM), se llevó a cabo un análisis genómico a nivel de cambios en el número de copias de DNA.

**Métodos:** Se incluyeron en el estudio 74 GM integradas por 34 MM, 20MMQ de alto riesgo (MMQ-AR) y 20 GMSI. Además se analizó la sangre periférica de 10 pacientes. Mediante "SNP-arrays" (Genome-Wide Human SNP Array 6.0) se analizaron las alteraciones en el número de copias (ANC) (las ganancias y pérdidas de material cromosómico), las regiones mínimas comúnmente delecionadas o ganadas, así como la existencia de subclones minoritarios, de deleciones homocigotas y de regiones con pérdida de heterocigosidad (LOH) y disomía uniparental (UPD).

**Resultados:** El número global de ANC fue progresivamente en aumento en los estadios evolutivos de las GM (medianas 5, 7.5 y 12 en GMSI, MMQ-AR y MM respectivamente;  $P=0.006$  GMSI vs MM). Las ganancias 1q+, 3p+, 6p+, 9p+, +11, +19 y 21q+ junto a las pérdidas 1p-, 4q-, 16q- y 22q- fueron significativamente más frecuentes en estadios avanzados, mientras que 7p+, 18q+, 6q-, 12q-, 13q- y -X mostraron una incidencia >10% y similar independientemente de la entidad analizada. Al analizar los subclones minoritarios (ANC presentes en <50% de las CP) se observó que el 75% de las GMSI presentaban subpoblaciones de estas características mientras que sólo el 56% y 30% de los MMQ y MM respectivamente lo hacían (GMSI vs MM  $P=0.017$ ). Además, cuando se revisaron aquellas alteraciones exclusivas del MM tales como 11q+, 21q+, 16q- y 22q-, se objetivó que ya se encontraban presentes en un

porcentaje de entre el 5-20% en las GMSI en forma de subclon minoritario. Se definieron 22 regiones comúnmente delecionadas y 9 ganadas, muchas de las cuales incluían genes relevantes, tales como WWOX y MAF en 16q22.1-q23.1. Un 6.5% de los pacientes presentaron deleciones homocigotas que abarcaban un total de 23 genes, entre ellos BIRC3 y PRAME. Dos pacientes con GMSI presentaron una deleción homocigota idéntica en 2p22.3 y otros dos en 8p11.23-p11.22.

**Conclusiones:** Las tecnologías genómicas modernas de alta resolución permiten establecer diferencias entre GMSI, MMQ-AR y MM que pueden ser las responsables de la progresión de una entidad a otra. En este sentido, el análisis global del genoma mediante SNP-arrays muestra un aumento significativo y progresivo de la frecuencia de alteraciones cromosómicas y LOH desde las formas indolente de GN al MM sintomático. Sin embargo, a pesar de que el MM tiene más alteraciones cromosómicas y más LOH que las entidades premalignas, la transición de GMSI a MM no se asocia con la adquisición de una alteración cromosómica determinada, sino más bien con una expansión clonal de subclones aberrantes ya presentes en la GMSI.

**ABSTRACT:**

Genetic events mediating transformation from pre-malignant monoclonal gammopathies (MG) to multiple myeloma (MM) are unknown. To obtain a comprehensive genomic profile of MG from the early to late stages we performed high-resolution analysis of purified plasma cells from 20 MGUS, 20 smoldering MM (SMM) and 34 MM by high-density 6.0 SNP-array. A progressive increase in the incidence of copy number abnormalities (CNA) from MGUS to SMM and to MM (median 5, 7.5 and 12 per case, respectively) was observed ( $P=0.006$ ). Gains on 1q, 3p, 6p, 9p, 11q, 19p, 19q and 21q along with 1p, 16q and 22q deletions were significantly less frequent in MGUS than in MM. Although 11q and 21q gains together with 16q and 22q deletions were apparently exclusive of MM status, we observed that these abnormalities were also present in minor subclones in MGUS. Overall, a total of 65 copy number-neutral LOH (CNN-LOH) were detected. Their frequency was higher in active MM than in the asymptomatic entities ( $P=0.047$ ). A strong association between genetic lesions and fragile sites was also detected. In summary, our study shows an increasing genomic complexity from MGUS to MM and identifies new chromosomal regions involved in CNA and CNN-LOH.

## INTRODUCTION

Multiple myeloma (MM) is a malignant disorder characterized by the accumulation of clonal plasma cell (PC) in the bone marrow (BM). Recent epidemiological studies have demonstrated that MM evolves from a previous premalignant condition in most patients.<sup>1,2</sup> Both MGUS and smoldering MM (SMM) are considered to be precursors of active MM.<sup>3,4</sup> However, the rate of progression of these two premalignant conditions to symptomatic MM differs greatly. Thus, while MGUS evolves to MM or a related malignancy at a rate of 1% per year,<sup>5</sup> the cumulative probability of progression to active MM or amyloidosis in SMM is 10% per year in the first five years.<sup>6</sup>

The current pathogenic models assume that MM develops through a multistep transformation from normal PC to MGUS, which implies PC immortalization and, subsequently, the transformation to active MM, where clonal PC cause end-organ damage.<sup>7,8</sup> Cytogenetic studies using fluorescence *in situ* hybridization (FISH) have demonstrated that most genetic lesions typical of MM are already present in MGUS stage.<sup>9-11</sup> We recently have shown that a major difference between these three entities is the number of PC with genetic abnormalities, which increases from MGUS to SMM and to MM.<sup>12</sup> It demonstrates that the progression from MGUS to SMM, and eventually to MM, involves a clonal expansion of genetically abnormal PC.<sup>12</sup> However, the genetic abnormalities characteristic of each evolving stage of monoclonal gammopathy (MG) have not been elucidated. This suggests that the chromosomal regions explored so far are not involved in the MG transformation or that the progression from one entity to another is associated with subtle genetic lesions beyond the resolving power of classical cytogenetics and FISH. More sophisticated genomic technologies might allow us to explore the whole genome at a high level of resolution and thereby uncover genetic abnormalities underlying the transformation from premalignant conditions to active MM.

The development of microarray technology has enabled high-resolution, genome-wide analysis based on single nucleotide polymorphisms (SNPs). This methodology scans the genome at 680-bp intervals on average and is able to reveal

gains and losses as well as regions of loss of heterozygosity (LOH). Moreover, the full range of somatically acquired genetic alterations, including point mutations, can be identified using the new generation of sequencing technologies. Although SNP-based mapping arrays have been used in several studies to identify gains and losses in myeloma samples,<sup>13,14</sup> and a recent report has identified unknown somatic mutations in myeloma using whole genome sequencing,<sup>15</sup> there has been no high-sensitivity analysis comparing copy number alterations (CNA) in MGUS, SMM and MM.

In the present study, we have performed for the first time a comprehensive high-resolution analysis of genomic imbalances by high-density 6.0 SNP array in 20 MGUS, 20 SMM and 34 MM patients in order to search for the genetic lesions that may be involved in the transformation from MGUS to MM.

## MATERIAL AND METHODS

### Patients

BM samples were obtained from patients with MGUS (n=20), high-risk SMM (n=20) and newly diagnosed MM (n=34). To avoid misclassification or overlapping entities we decided to focus on MGUS patients with more than two years of stable follow-up, high-risk SMM and symptomatic MM using the International Myeloma Working Group criteria.<sup>16</sup> All samples came from newly diagnosed, untreated patients. High-risk SMM was defined as the presence of >10% PC in BM and a monoclonal component IgG $\geq$ 3 g/dL, IgA $\geq$ 2 g/dL or Bence Jones proteinuria $\geq$ 1 g/24 h, together with absence of CRAB (Calcium increase, Renal insufficiency, Anemia, Bone lesions).<sup>6</sup> Patients meeting either but not both criteria were also included in the study if they fulfilled the additional criteria of having  $\geq$ 95% phenotypically aberrant PC in the BM PC compartment (aPC/BMPC) and immunoparesis.<sup>4</sup> 10 matched non-tumor DNA samples were also included in the analysis. The study was approved by the research ethics committees of all participating centers and written informed consent was obtained from all patients in accordance with the Helsinki Declaration. The main clinical and laboratory characteristics of these patients are presented in Supplementary Table 1.

### Sample preparation

CD138-positive PC isolation was carried out in all the BM samples using the AutoMACS automated separation system (Miltenyi-Biotec, Auburn, CA, USA). Final purity was >95% in all MM and SMM cases, and >90% in MGUS patients. After purification, the selected cells were split for FISH and DNA extraction. DNA was extracted using commercially available kits (Allprep Kit, Qiagen, Valencia, CA) according to the manufacturer's instructions. DNA quality and quantity were determined using a ND-1000 Spectrophotometer (Nano-Drop Technologies, Wilmington, DE).



**Supplementary Table 1.** Clinical and biological characteristics of the patients.

<b>Characteristics</b>	<b>All Patients</b>	
<b>MGUS (n=20)</b>		
Sex(%)	Male	60
	Female	40
Age (years)	79 (54-85)	
Ig subtype (%)	IgG	74
	IgA	26
Bone Marrow Plasma Cells (%)	4 (2-8)	
aPC/BMPC (%) Flow Cytometry	88.5 (46-100)	
<b>SMM (n=20)</b>		
Sex (%)	Male	60
	Female	40
Age (years)	66.5 (39-79)	
Ig subtype (%)	IgG	50
	IgA	50
Bone Marrow Plasma Cells (%)	15 (3-42)	
aPC/BMPC (%) Flow Cytometry	100 (80-100)	
<b>MM (n=34)</b>		
Sex (%)	Male	49
	Female	51
Age (years)	65.5 (48-72)	
Ig subtype	IgG	48
	IgA	43
	BJ Protein	12
ISS	I	30
	II	45
	III	25
Bone Marrow Plasma Cells (%)	33 (6-90)	
aPC/BMPC (%) Flow Cytometry	100 (82-100)	

### SNP arrays and data analyses

The simultaneous genome-wide detection of CNA and LOH were investigated using the standard Affymetrix® Genome-Wide Human SNP Array 6.0 assay protocol (Affymetrix, Santa Clara, CA). Briefly, genomic DNA was digested with Nsp I and Sty I restriction enzymes, ligated to adaptors and amplified by PCR. PCR products were concentrated and fragmented, and then end-labeled with biotin, denatured, and hybridized to the SNP array 6.0. The arrays were processed using the Fluidics Station 450, GeneChip Scanner 3000 7G and AGCC (AffymetrixGeneChip Command Console

Software). Given that matched normal DNA was not available in all cases, an unpaired analysis was performed using 240 Hapmap files as reference. However, 10 tumors were also analyzed against their own genomic matched normal DNA. The complete dataset was analyzed by visual inspection using the Genotyping Console 4.0 (Affymetrix), dCHIP and Chromosome Analysis Suite (ChAS) software (Affymetrix). Two of the authors (LLC and MES) independently reviewed the copy number results for all patients and all chromosomes, and visually scored lesions. CNA were reported when the three following criteria were achieved: minimum of ten markers per segment, 100 Kb minimum genomic sizes and <50% overlap with known copy number variants (CNV) (Database of Genomic Variants).<sup>17</sup> Only copy number-neutral LOH (CNN-LOH) larger than 5MB were considered.<sup>18</sup> Since homozygous deletions are a rare event, all of them were considered without meeting the aforementioned criteria, taking into account that CNV commonly observed as a heterozygous deletion in the general population, may have a pathogenic outcome when present in homozygous state.<sup>19</sup>

The Genotyping Console provides information about the genomic changes at five levels: copy number state,  $\log_2$  ratio, smooth signal, allele difference and LOH. The smooth signal takes integer values between 0 and 4 (1 for monosomy, 2 for diploidy, 3 for trisomy and 4 for tetrasomy). A continuous consistent line in the copy number state window along with a smooth signal at position 1 indicates loss of a region, while gain of a region is recognized when a continuous consistent line in the copy number window along with a smooth signal at position 3 is present. However, visual inspection allowed us to detect intermediate situations corresponding to imbalances present in minor populations (less than 50%) coexisting with the major diploid population (more than 50%). These sub-clones were identified according to the following “in-house” criteria: i) a discontinuous line in the copy number state window, compared to a continuous consistent line representing the major clonal population; ii) intermediate values in the smooth signal, such as 2.5 when only a minor clone had acquired the gain, or 1.5 when only a minor clone had experienced a loss; and iii) confirmation in the LOH state window, since LOH only emerge when a major clonal population is present (See supplementary Figure 1 for further details).

Full SNP array data are available at the Gene Expression Omnibus ([www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/), Accession Number GSE31339).

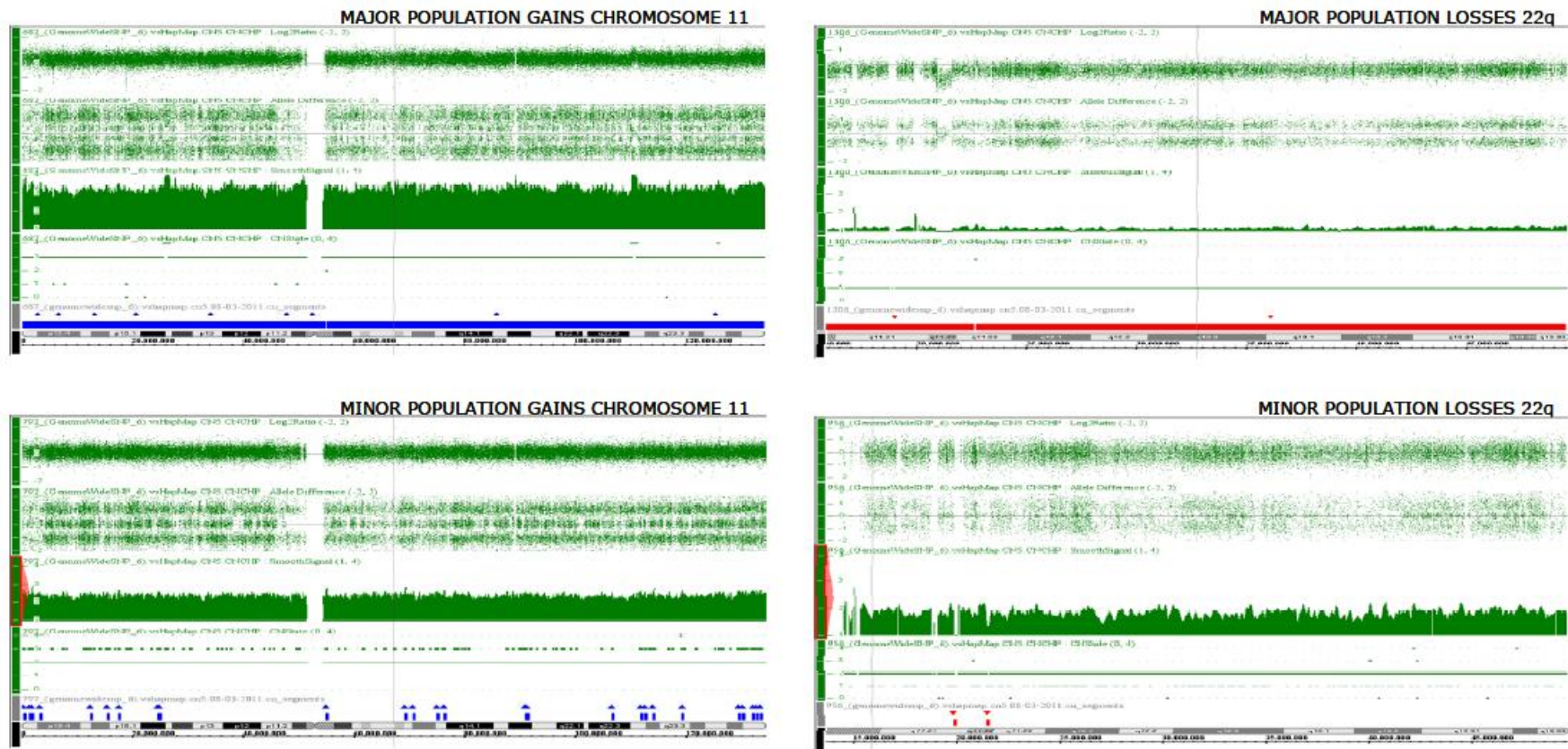


Figure Supplementary 1: Visual inspection of minor and major clones with CNAs with Genotyping Console 4.0.

### **Cytogenetic analyses**

The systematic screening for genomic aberrations in our institution includes interphase fluorescence *in situ* hybridization (FISH) studies for detecting immunoglobulin heavy chain gene (*IGH*) rearrangements —t(11;14)(q13;q32), t(4;14)(p16;q32) and t(14;16)(q32;q23)— with the corresponding dual-color, dual-fusion translocation probes (Abbott Molecular/Vysis), 13q (LSI 13, RB1 13q14) and 17p deletions (LSI p53, 17p13.1) (Abbott Molecular/Vysis), and 1q gains (on 1q21/SRD 1p36, Kreatech Diagnostics, Amsterdam, The Netherlands).<sup>20</sup> The FISH results of all the patients included in the present study have been previously reported.<sup>12</sup>

### **Statistical analyses**

SPSS version 15.0 (SPSS Inc.) was used for statistical analysis. The  $\chi^2$  and Fisher's exact tests were used to measure associations between genetic abnormalities and other categorical variables. The Wilcoxon rank-sum test was used for continuous variables. Values of  $P \leq 0.05$  were considered to be statistically significant.

## RESULTS

### Quality assessment of SNP-arrays

Ten paired normal peripheral blood (PB) samples were simultaneously run on the Genotyping Console and visually analyzed in parallel with their paired tumoral samples. We did not observe any CNA in the PB samples apart from those overlapping with known CNV.

Since FISH analysis of 1q21, 13q and 17p13 was available for all patients we aimed to compare the genomic changes detected by SNP arrays in these three regions with the FISH results. Only five discordant cases were observed out of more than 65 imbalances detected by both techniques. Four of these discordant cases, affecting 13q and 1q, were detected by FISH but not by SNP-array analysis. Nevertheless, a more detailed analysis of two of them revealed a small population bearing such abnormalities. In the fifth discordant case, corresponding to an SMM sample, the SNP arrays detected an interstitial deletion at 13q14.2, extending from 47596000 to 47666069 bp, which was not observed by FISH. This could be because the probe only covered part of the deleted region and was therefore too short to be resolved with the naked eye.

### Copy number abnormalities

Chromosomal imbalances were identified in 69 (93%) of the 74 patients analyzed. The only five cases with no CNA were from asymptomatic entities (2 MGUS and 3 SMM patients), while all MM patients showed at least one CNA. Overall, a total of 703 DNA copy number changes were detected with a median of 8 imbalances per abnormal case (range, 1-32 imbalances): 374 gains with a median of 4 per abnormal case (range, 1-20) and 329 losses with a median of 3 (range 1-29). A detailed description of the most frequent aberrations is shown in Supplementary Table 2.

We next compared the three types of MG, observing a progressive increase in the incidence of genomic imbalances from MGUS (median, 5/case) to SMM (median,

7.5/case) to MM (median, 12/case) ( $P=0.006$ ; MGUS vs. MM) (Table 1). A similar pattern was observed when we considered the gains separately: the median numbers/case were 1.5, 3 and 6.5 for MGUS, SMM and MM respectively ( $P<0.001$  and  $0.025$  for the comparison with MM); for the losses the significant differences ( $P=0.033$ ) were observed only between MGUS (1.5/case) and MM (4/case), with the SMM cases showing a similar frequency to MM (3.5/case) (Table 1).

**Table 1:** Frequency of CNA in monoclonal gammopathy patients

	<b>Gains</b>	<b>Losses</b>	<b>Genomic imbalances</b>	<b>Only gains</b>	<b>Only losses</b>	<b>Without CNA</b>
	<i>Median (range)</i>	<i>Median (range)</i>	<i>Median (range)</i>	<i>Cases (%)</i>	<i>Cases (%)</i>	<i>Cases (%)</i>
<b>MGUS</b>	1.5 (1-8)	1.5 (1-9)	5 (1-12)	3 (15%)	3 (15%)	2 (10%)
<b>SMM</b>	3 (1-12)	3.5 (1-14)	7.5 (1-23)	1 (5%)	2 (10%)	3 (15%)
<b>MM</b>	6.5 (1-20)	4 (1-29)	12 (1-32)	2 (10%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>Significant Comparisons</b>	<i>SMM vs. MM <math>P=0.025</math> MGUS vs. MM <math>P&lt;0.001</math></i>	<i>MGUS vs. MM <math>P=0.033</math></i>	<i>MGUS vs. MM <math>P=0.006</math></i>			

When we analyzed the frequency of specific chromosomal abnormalities according to the type of MG, we found that gains on 1q, 3p, 6p, 9p, 11q, 19p, 19q and 21q along with 1p, 16q and 22q deletions were significantly less frequent in MGUS than in symptomatic MM (Table 2). Interestingly, 11q and 21q gains, together with 16q and 22q deletion were exclusive of MM status, as they were not detected in any of the MGUS patients. Additionally, the incidence of gains on 11p, 11q, 19p, 19q and 21q, and 4q deletions were also significantly lower in SMM than in MM disease (Table 2). Comparing the two premalignant states we only found a significant difference in the 16q deletion, which was not present in MGUS but was observed in 30% of SMM ( $P=0.038$ ) (Table 2). Otherwise, some CNA, such as 7 trisomy and 18q gain, 6q and 12q deletion and 13, and X monosomy, were present at similar frequencies in the three entities (Supplementary Table 2). This suggests that particular chromosomal abnormalities may be acquired progressively during the evolution of MG while others are already present from the first stages. Table 2 summarizes the chromosomal imbalances whose frequency differed significantly between the three entities. More detailed information can be found in Supplementary Table 2. Figure 1 shows all the genomic changes organized by MG type and chromosome.

We next focused on the size of the abnormality and observed that, while some chromosomes usually showed complete gains or losses, others only had short interstitial alterations. Most of the gains affected either the whole chromosome (trisomies of odd-numbered chromosomes: 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 and 21), or the whole arm (1q and 6p) with very unusual interstitial gains. By contrast, the loss of chromosomal material was more frequently interstitial (1p, 4, 6q, 8p, 9p, 10, 12, 14q, 17p, 22) although losses of whole chromosomes (monosomy of X and 13) and of chromosomal arms (16q and 20p deletions) were also observed. There were no differences in the size of particular abnormalities with respect to the type of MG.

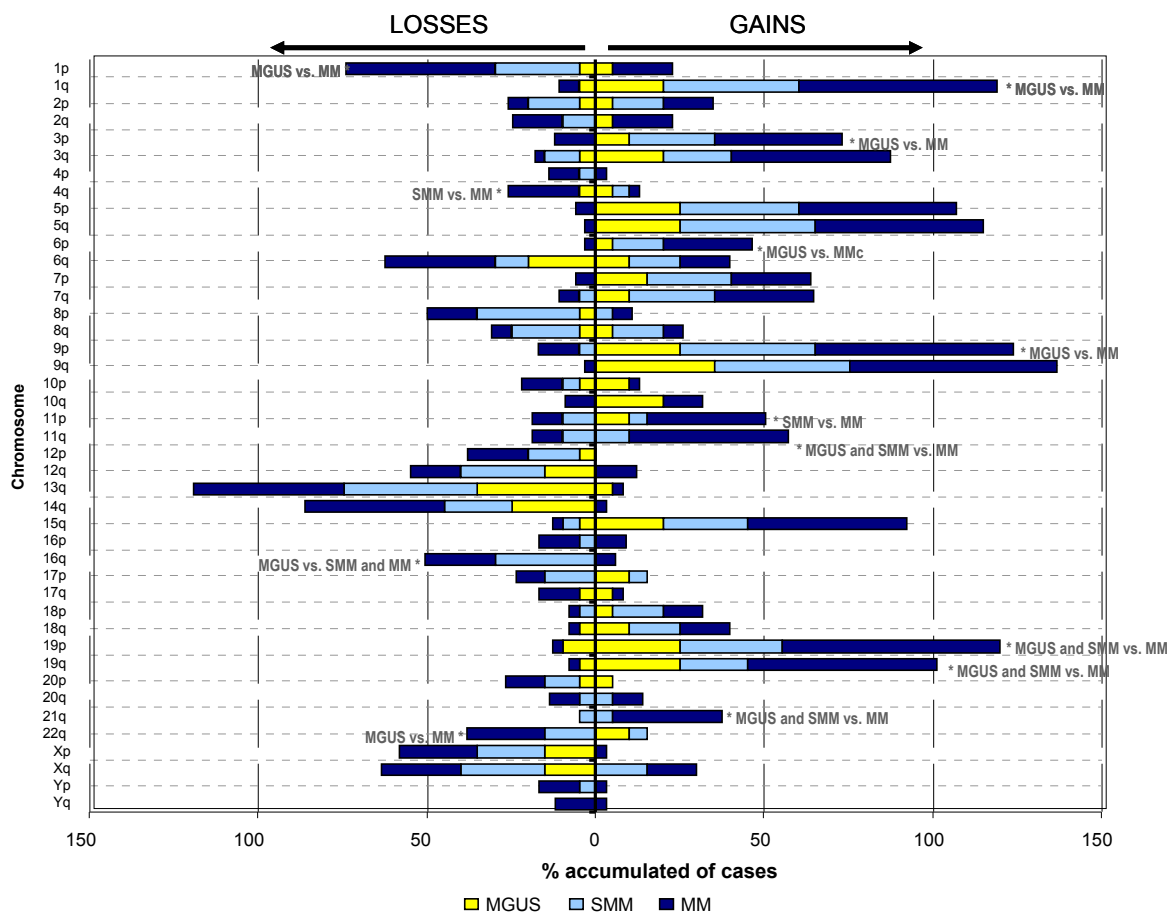
**Table 2:** Significantly different frequencies of gains and losses in monoclonal gammopathies.

<b>Copy Number Gains</b>				
	<b>MGUS (n=20) patients (%)</b>	<b>SMM (n=20) patients (%)</b>	<b>MM (n=34) patients (%)</b>	<b>P</b>
<b>1q</b>	4 (20%)	8 (40%)	20 (58.8%)	<i>0.013 (MGUS vs. MM)</i>
<b>3p</b>	2 (10%)	5 (25%)	13 (38.2%)	<i>0.05 (MGUS vs. MM)</i>
<b>6p</b>	1 (5%)	3 (15%)	9 (26%)	<i>0.05 (MGUS vs. MM)</i>
<b>9p</b>	5 (25%)	8 (40%)	20 (59%)	<i>0.034 (MGUS vs. MM)</i>
<b>11p</b>	2 (10%)	1 (5%)	12 (35%)	<i>0.019 (SMM vs. MM)</i>
<b>11q</b>	0 (0%)	2 (10%)	16 (47%)	<i>0.001 (MGUS vs. MM) 0.013 (SMM vs. MM)</i>
<b>19p</b>	5 (25%)	6 (30%)	22 (65%)	<i>0.011 (MGUS vs. MM) 0.029 (SMM vs. MM)</i>
<b>19q</b>	5 (25%)	4 (20%)	19 (56%)	<i>0.05 (MGUS vs. MM) 0.022 (SMM vs. MM)</i>
<b>21q</b>	0 (0%)	1 (5%)	11 (32%)	<i>0.004 (MGUS vs. MM) 0.022 (SMM vs. MM)</i>
<b>Copy Number Deletions</b>				
	<b>MGUS (n=20) patients (%)</b>	<b>SMM (n=20) patients (%)</b>	<b>MM (n=34) patients (%)</b>	<b>p value</b>
<b>1p</b>	1 (5%)	5 (25%)	15 (44%)	<i>0.006 (MGUS vs. MM)</i>
<b>4q</b>	1 (5%)	0 (0%)	7 (21%)	<i>0.038 (SMM vs. MM)</i>
<b>16q</b>	0 (0%)	6 (30%)	7 (21%)	<i>0.02 (MGUS vs. SMM) 0.038 (MGUS vs. MM)</i>
<b>22q</b>	0 (0%)	3 (15%)	8 (23%)	<i>0.020 (MGUS vs. MM)</i>



Supplementary Table 2: Frequency of deletions and gains in Monoclonal Gammopathies patients

	GAINS			p value	DELETIONS			p value
	MGUS (n=20) patients (%)	SMM (n=20) patients (%)	MM (n=34) patients (%)		MGUS (n=20) patients (%)	SMM (n=20) patients (%)	MM (n=34) patients (%)	
<b>1p</b>	1 (5%)	0 (0%)	6 (17.6%)	NS	1 (5%)	5 (25%)	15 (44.1%)	P=0.006 (MGUS vs MM)
<b>1q</b>	4 (20%)	8 (40%)	20 (58.8%)	P=0.013 (MGUS vs MM)	1 (5%)	0 (0%)	2 (5.9%)	NS
<b>2p</b>	1 (5%)	3 (15%)	5 (14.7%)	NS	1 (5%)	3 (15%)	2 (5.9%)	NS
<b>2q</b>	1 (5%)	0 (0%)	6 (17.6%)	NS	0 (0%)	2 (10%)	5 (14.7%)	NS
<b>3p</b>	2 (10%)	5 (25%)	13 (38.2%)	P=0.05 (MGUS vs MM)	0 (0%)	0 (0%)	4 (11.8%)	NS
<b>3q</b>	4 (20%)	4 (20%)	16 (47.1%)	NS	1 (5%)	2 (10%)	1 (2.9%)	NS
<b>4p</b>	0 (0%)	0 (0%)	1 (2.9%)	NS	0 (0%)	1 (5%)	3 (8.8%)	NS
<b>4q</b>	1 (5%)	1 (5%)	1 (2.9%)	NS	1 (5%)	0 (0%)	7 (20.6%)	P=0.038 (SMM vs MM)
<b>5p</b>	5 (25%)	7 (35%)	16 (47%)	NS	0 (0%)	0 (0%)	2 (5.9%)	NS
<b>5q</b>	5 (25%)	8 (40%)	17 (50%)	NS	0 (0%)	0 (0%)	1 (2.9%)	NS
<b>6p</b>	1 (5%)	3 (15%)	9 (26.5%)	P=0.05 (MGUS vs MM)	0 (0%)	0 (0%)	1 (2.9%)	NS
<b>6q</b>	2 (10%)	3 (15%)	5 (14.7%)	NS	4 (20%)	2 (10%)	11 (32.4%)	NS
<b>7p</b>	3 (15%)	5 (25%)	8 (23.5%)	NS	0 (0%)	0 (0%)	2 (5.9%)	NS
<b>7q</b>	2 (10%)	5 (25%)	10 (29.4%)	NS	0 (0%)	1 (5%)	2 (5.9%)	NS
<b>8p</b>	0 (0%)	1 (5%)	2 (5.9%)	NS	1 (5%)	6 (30%)	5 (14.7%)	NS
<b>8q</b>	1 (5%)	3 (15%)	2 (5.9%)	NS	1 (5%)	4 (20%)	2 (5.9%)	NS
<b>9p</b>	5 (25%)	8 (40%)	20 (58.8%)	P=0.034 (MGUS vs MM)	0 (0%)	1 (5%)	4 (11.8%)	NS
<b>9q</b>	7 (35%)	8 (40%)	21 (61.8%)	NS	0 (0%)	0 (0%)	1 (2.9%)	NS
<b>10p</b>	2 (10%)	0 (0%)	1 (2.9%)	NS	1 (5%)	1 (5%)	4 (11.8%)	NS
<b>10q</b>	4 (20%)	0 (0%)	4 (11.8%)	NS	0 (0%)	0 (0%)	3 (8.8%)	NS
<b>11p</b>	2 (10%)	1 (5%)	12 (35.3%)	P=0.019 (SMM vs MM)	0 (0%)	2 (10%)	3 (8.8%)	NS
<b>11q</b>	0 (0%)	2 (10%)	16 (47.1%)	P=0.001 (MGUS vs MM) P=0.013 (SMM vs MM)	0 (0%)	2 (10%)	3 (8.8%)	NS
<b>12p</b>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	NS	1 (5%)	3 (15%)	6 (17.6%)	NS
<b>12q</b>	0 (0%)	0 (0%)	4 (11.8%)	NS	3 (15%)	5 (25%)	5 (14.7%)	NS
<b>13q</b>	1 (5%)	0 (0%)	1 (2.9%)	NS	7 (35%)	8 (40%)	15 (44.1%)	NS
<b>14q</b>	0 (0%)	0 (0%)	1 (2.9%)	NS	5 (25%)	4 (20%)	14 (41.2%)	NS
<b>15q</b>	4 (20%)	5 (25%)	16 (47.1%)	NS	1 (5%)	1 (5%)	1 (2.9%)	NS
<b>16p</b>	0 (0%)	0 (0%)	3 (8.8%)	NS	0 (0%)	1 (5%)	4 (11.8%)	NS
<b>16q</b>	0 (0%)	0 (0%)	2 (5.9%)	NS	0 (0%)	6 (30%)	7 (20.6%)	P=0.02 (MGUS vs SMM) P=0.038 (MGUS vs MM)
<b>17p</b>	2 (10%)	1 (5%)	0 (0%)	NS	0 (0%)	3 (15%)	3 (8.8%)	NS
<b>17q</b>	1 (5%)	0 (0%)	1 (2.9%)	NS	1 (5%)	0 (0%)	4 (11.8%)	NS
<b>18p</b>	1 (5%)	3 (15%)	4 (11.8%)	NS	0 (0%)	1 (5%)	1 (2.9%)	NS
<b>18q</b>	2 (10%)	3 (15%)	5 (14.7%)	NS	1 (5%)	0 (0%)	1 (2.9%)	NS
<b>19p</b>	5 (25%)	6 (30%)	22 (64.7%)	P=0.011 (MGUS vs MM) P=0.029 (SMM vs MM)	2 (10%)	0 (0%)	1 (2.9%)	NS
<b>19q</b>	5 (25%)	4 (20%)	19 (55.9%)	P=0.05 (MGUS vs MM) P=0.022 (SMM vs MM)	1 (5%)	0 (0%)	1 (2.9%)	NS
<b>20p</b>	1 (5%)	0 (0%)	0 (0%)	NS	1 (5%)	2 (10%)	4 (11.8%)	NS
<b>20q</b>	0 (0%)	1 (5%)	3 (8.8%)	NS	0 (0%)	1 (5%)	3 (8.8%)	NS
<b>21q</b>	0 (0%)	1 (5%)	11 (32.4%)	P=0.004 (MGUS vs MM) P=0.022 (SMM vs MM)	0 (0%)	1 (5%)	0 (0%)	NS
<b>22q</b>	2 (10%)	1 (5%)	0 (0%)	NS	0 (0%)	3 (15%)	8 (23.5%)	P=0.02 (MGUS vs MM)
<b>Xp</b>	0 (0%)	0 (0%)	1 (2.9%)	NS	3 (15%)	4 (20%)	8 (23.5%)	NS
<b>Xq</b>	0 (0%)	3 (15%)	5 (14.7%)	NS	3 (15%)	5 (25%)	8 (23.5%)	NS
<b>Yp</b>	0 (0%)	0 (0%)	1 (2.9%)	NS	0 (0%)	1 (5%)	4 (11.8%)	NS
<b>Yq</b>	0 (0%)	0 (0%)	1 (2.9%)	NS	0 (0%)	0 (0%)	4 (11.8%)	NS

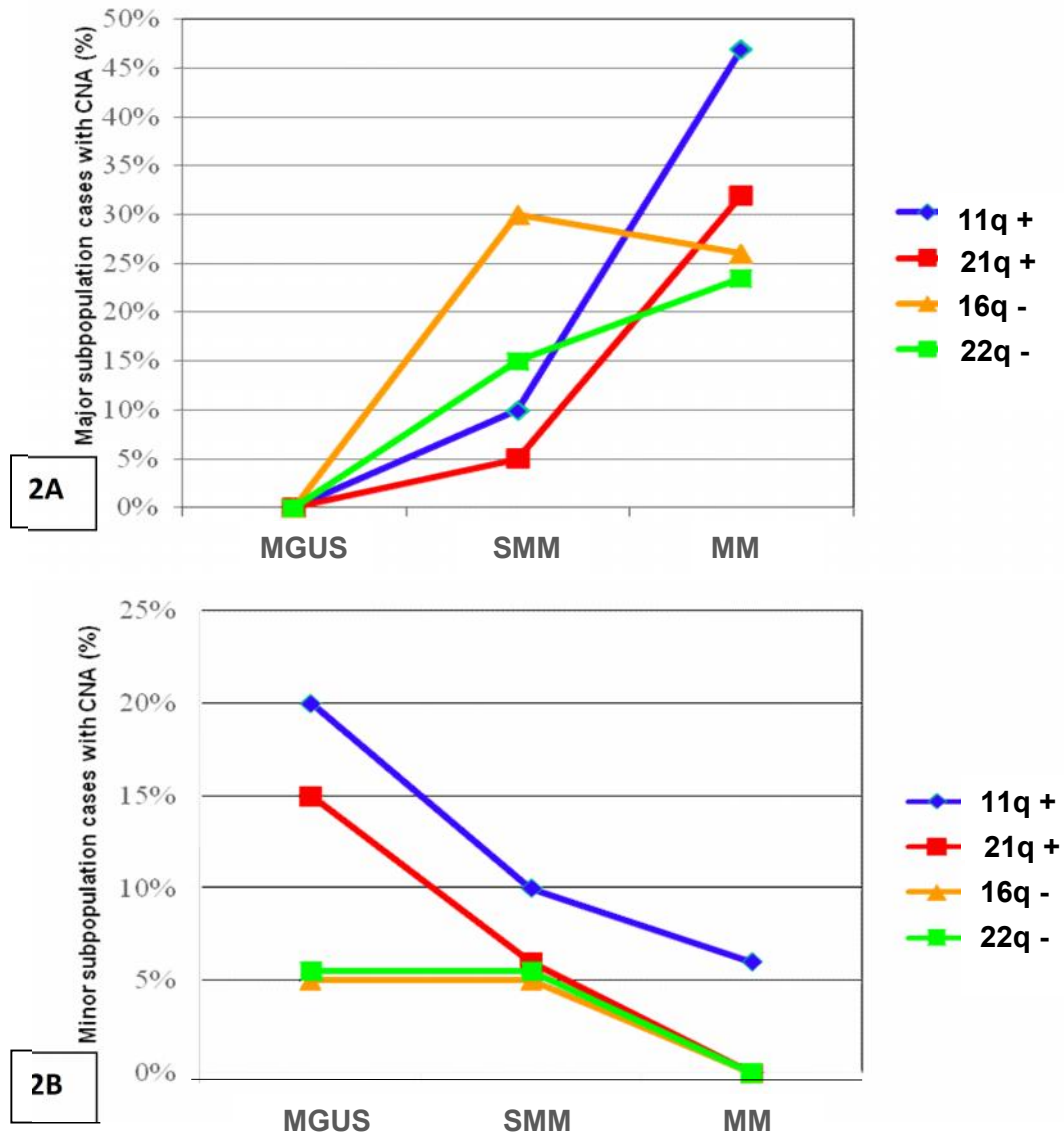


**Figure 1: Summary of percentage of aberrations per chromosome in MGUS, SMM and MM.** This figure summarizes the percentage of aberrations per chromosome observed in MGUS (white), SMM (grey) and MM (black) patients. The asterisk represents the statistically significant comparisons. The proportion displayed in horizontal indicates the accumulated percentage of cases. For example, 1q+ is observed in 20% of the MGUS, 40% of the SMM and 59% of the MM. This point has been now clarified in the figure legend.

### PC bearing CNA increase from MGUS to SMM and to MM

We observed at least one minor subclone (<50% of PC) carrying a CNA more frequently in MGUS (75% of cases; median of 3.5 of subclones/case, range 1-12) than in SMM (30% of cases; median of 1, range 1-19) and MM (56% of cases; median of 1/case, range 1-16) ( $P=0.017$  in the comparison of MGUS vs. SMM+MM). When we compared the presence of minor and major subclones for a particular CNA, we observed that the minor subclones predominated in MGUS, while in MM patients (both symptomatic and asymptomatic disease) the major subpopulation was the

predominant one. Interestingly, subclone analysis revealed that the four abnormalities initially only detected in MM (11q, 21q gains and 16q, 22q losses) but not in MGUS (Figure 2A) were also found as a minor subpopulation in MGUS samples (Figure 2B).



**Figure 2: Schematic representation of percentage of cases carrying specific alterations as a major and minor subpopulations.** Those abnormalities apparently exclusive of myeloma disease (Figure 2A) were also found as minor subpopulation in MGUS samples (Figure 2B). Thus, 11q gains which were detected in 16 MM in more than 50% of PC population were also present in 4 MGUS when the minor subclones were assessed visually.

### Minimal common regions (MCR)

In an attempt to narrow down the size of the recurrent chromosome imbalances, minimal overlapping regions were delineated for all the chromosome regions affected in at least 25% of the patients. We identified nine minimally gained regions (MGR) and 22 minimally deleted regions (MDR) involving a median number of 43 genes. We found five MGR at 1q21.3, 6p22.3-p25.3, 8q22.2-q22.3, 18q12.2, and Xq25-q28, and seven MDR at 1p21.1-p21.3, 1p13.3, 8p12-p23.3, 11p11.2, 12p13.2, 17p13.1 and 20p12.1-p12.2 that were present in at least 80% of the patients with CNA in those regions (Table 3).

We also wanted to explore the incidence of focal-recurrent CNA, defined as a delimited region, smaller than 500 Kb that is identical in at least two different patients. We observed eight focal-recurrent CNA that fulfilled this criterion, six of which contained genes (Table 4). Two of these regions were lost in two MGUS, one at 12q22 containing two genes (*NUDT4* and *UBE2N*) and the other at 19p13.2, including three zinc finger proteins (*ZNF709*, *ZNF564* and *ZNF490*). We also found two focal regions deleted in two MM patients, located at 8q13.1 and 9p23, which encompassed 136 and 460 Kb and contained two genes (*MTRF1* and *PDE7A*) and one gene (*PTPRD*), respectively (Table 4).

**Table 3:** Minimal common regions of gain and loss in monoclonal gammopathies

Cytogenetic band	Start (Kb)	End (Kb)	Size(Kb)	Known genes	hsa-miRNAs	Gains			
						MGUS (n=20)	SMM (n=20)	MM (n=34)	CNA frequency
1q21.3	152964.807	153134.736	169.929	<i>KCNN3</i>	-	2 (10%)	6 (30%)	18 (53%)	26/32 (81%)
6p22.3-p25.3	0	19360.123	19360.123	64	4645, 3691, 4639, 548-a	1 (5%)	3 (15%)	8 (23%)	12/13 (92%)
8q22.2-q22.3	100858.156	102001.297	1143.141	11	1273, 4471	1 (5%)	3 (15%)	1 (3%)	5/6 (83%)
16p12.1	22640.22	22820.242	180.022	<i>HS3ST2</i>	-	0	0	2 (6%)	2/3 (66%)
16p11.2	29041.606	31888.215	2846.609	87	3680, 4518, 4519, 762	0	0	2 (6%)	2/3 (66%)
17p11.2	13139.428	17043.828	3904.4	-	548h-3, 4731, 1288	1 (5%)	1 (5%)	0	2/3 (66%)
18q12.2	31747.573	31927.415	179.842	<i>p15rs, c18orf21</i>	-	1 (5%)	3 (15%)	5 (15%)	9/10 (90%)
20q11.22	31333.726	32156.786	823.06	12	-	0	0	3 (9%)	3/4 (75%)
Xq25-q28	120740.551	154850.491	34109.94	201	50 miRs	0	3 (15%)	5 (15%)	8/8 (100%)

Cytogenetic band	Start (Kb)	End (Kb)	Size(Kb)	Number of genes*	hsa-miRNAs	Losses			
						MGUS (n=20)	SMM (n=20)	MM (n=34)	CNA frequency
1p21.1-p21.3	94498.2	106994.8	12496.6	41	378g, 2682, 137,553	2 (10%)	5 (25%)	11 (32%)	18/21 (86%)
1p13.3	111176.8	111283.1	106.3	<i>CD53, C10RF103</i>	-	1 (5%)	5 (25%)	12 (35%)	18/21 (86%)
1p31.1	71647.0	71918.0	271.0	<i>NEGR1</i>	-	1 (5%)	2 (10%)	7 (20%)	10/21 (48%)
1p33	46494.0	51297.4	4803.4	<i>FAF1, CDKN1C</i>	-	1 (5%)	2 (10%)	6 (18%)	9/21 (43%)
2q35	218972.7	219106.7	134.0	<i>CTDSP1, VIL1, USP37</i>	-	0	1 (5%)	3 (9%)	4/7 (57%)
6q25.1-tel	152509.3	170800.0	18290.7	79	8 miRs	1 (5%)	2 (10%)	9 (26%)	12/17 (70%)
6q25.1	150054.0	150181.9	127.9	<i>LATS1, NUP43, PCMT1</i>	-	1 (5%)	2 (10%)	9 (26%)	12/17 (70%)
8p12-p23.3	0.0	31757.6	31757.6	185	22 miRs	1(5%)	6 (30%)	4 (12%)	11/12 (92%)
9p21.3	20951.4	24056.6	3105.2	<i>CDKN2A, CDKN2B</i>	31	0	1 (5%)	2 (6%)	3/5 (60%)
11p11.2	45957.2	46103.5	146.3	<i>PHF21A</i>	-	0	2 (10%)	2 (6%)	4/5 (80%)
11q21-q22.2	95833.4	102185.8	6352.4	20	1260b, 3920	0	1 (5%)	2 (6%)	3/5 (60%)
12q24.11	107500.0	110200.0	2700.0	38	4496, 619	2 (10%)	2 (10%)	4 (12%)	8/13 (61%)
12p13.2	10000.0	12600.0	2600.0	46	-	1 (5%)	3 (15%)	5 (15%)	9/10 (90%)
14q24.1-q31.1	66998.1	82603.4	15605.3	117	4505, 4709, 1260a	3 (15%)	2 (10%)	7 (21%)	12/23 (52%)
14q11.2	19515.7	22506.4	2990.7	66	-	1 (5%)	0	5 (15%)	6/23 (26%)
16q22.3-23.1	71827.4	73762.6	1935.1	15	-	0	4 (20%)	4 (12%)	8/13 (61%)
16q23.2-24.3	79145.6	88826.9	9681.3	96	4720,3182, 1910,4722	0	3 (15%)	5 (15%)	8/13 (61%)
16q12.1	46498.5	49153.4	2655.0	15	-	0	4 (20%)	4 (12%)	8/13 (61%)
17p13.1	8340.931	8471.997	131.066	<i>MYH10</i>	-	0	3 (15%)	2 (6%)	5/6 (83%)
20p12.1-p12.2	11332.8	15284.9	3952.1	9	-	1 (5%)	2 (10%)	3 (9%)	6/7 (86%)
22q13.2	40365.4	49520.2	9154.8	107	12 miRs	0	3 (15%)	1 (3%)	4/11 (36%)
22q12.1	26888.5	28527.7	1639.2	62	548j, 3199-1, 3199-2	0	3 (15%)	4 (12%)	7/11 (64%)

**Table 4:** Focal-recurrent CNA in monoclonal gammopathies

Cytogenetic band	Start (Kb)	End (Kb)	Size (Kb)	Known genes	MGUS (n=20)	SMM (n=20)	MM (n=34)
<b>GAINS</b>							
7p15.1	30665.8	30746.9	81.2	<i>CRHR2</i>	1 (5%)	–	1 (3%)
10q22.1	72428.6	72576.2	147.6	–	1 (5%)	–	1 (3%)
<b>LOSSES</b>							
8q13.1	66740.2	66875.9	135.7	<i>MTFR1, PDE7A</i>	–	–	2 (6%)
9p23	9331.8	9792.1	460.3	<i>PTPRD</i>	–	–	2 (6%)
10p12.2	23597.6	23677.6	79.9	<i>C108ORF7</i>	1 (5%)	–	1 (3%)
12q24.11	107543.8	107705	160.6	–	2 (10%)	1 (5%)	1 (3%)
12q22	92230.3	92389.6	159.3	<i>NUDT4, UBE2N</i>	2 (10%)	–	–
19p13.2	12430.4	12565.8	135.4	<i>ZNF709, ZNF564, ZNF490</i>	2 (10%)	–	–

**Copy number-neutral LOH (CNN-LOH)**

CNN-LOH was detected in 28 of the 74 MG patients (38%) with a median of two per case (range, 1-5; Supplementary figure 3 and Table 5). The frequency of CNN-LOH was significantly higher in active MM than in the asymptomatic entities (MM 53% vs. SMM 25% vs. MGUS 25%;  $P=0.047$ ). More than one region was affected by this phenomenon in most cases (median 2.5, range 1-5). Overall, 65 CNN-LOH were detected: 58 corresponded to CNN-LOH (52 partial and 6 complete CNN-LOH), while the remaining 7 loci had a copy number gain-LOH (CNG-LOH) (1q21.1-q44, 5q21.1-q23.3, 5q33.1-33.3, 6p21.31-p22.1, 9p13.3-p21.2, 15q11.2-q14, 15q23-q25.2). The median size of the CNN-LOHs was 33 Mb and the median number of genes was 188 per CNN-LOH. Of note, there were two identical interstitial CNN-LOH in one MGUS and one MM at 8q11.21-q11.23.

**Table 5:** Detailed copy number-neutral LOH (CNN-LOH) and copy number-gained LOH (CNG-LOH\*) in monoclonal gammopathies

<b>Patient</b>	<b>Cytogenetic region</b>	<b>Start (Kb)</b>	<b>End (Kb)</b>	<b>Size (Kb)</b>	<b>No of genes</b>
16-MGUS	12q21.31-q22	83092.5	92689.9	9597.4	32
17-MGUS	20q13.12-q13.2	42773.0	51602.8	8829.8	90
	2q33.2-q34	205134.7	213940.3	8805.6	40
	6q25.3-q26	156915.6	163645.1	6729.5	3
18-MGUS	11p14.1-p15.1	16456.1	27777.1	11321.1	55
	14q31.2-q32.2	83389.8	99521.7	16131.9	84
	18p11.31-q21.1	5284.7	43611.8	38327.2	131
	6q25.1-q27	149768.8	169466.6	19697.8	94
	<b>5q21.1-q23.3*</b>	99942.3	128905.9	28963.5	72
19-MGUS	17q11.2-q12	25323.8	31281.1	5957.3	62
	1p32.2-1p33.1	47200.9	58271.7	11070.7	78
	<b>15q11.2-q14*</b>	21835.0	34136.2	12301.1	48
20-MGUS	13q32.1-q33.2	95826.7	104914.9	9088.2	31
	1p22.3-1p31.1	82110.5	87850.3	5739.8	32
	5q21.1-q23.1	98606.3	115917.3	17311.0	43
	8q11.21-q11.23	47839.4	53546.1	5706.7	14
36-SMM	16p12.2-p13.13	11629.6	20533.3	8903.7	54
37-SMM	12q23.3-q24.33	106176.5	129872.7	23696.2	193
38-SMM	2p23.2-p25.3	39.7	28486.6	28446.9	146
	6p21.33-p25.3	181.6	30775.5	30593.9	242
39-SMM	9	154.0	140134.1	139980.1	353
	17p	2225.0	19356.5	17131.6	269
40-SMM	11	142.9	134418.9	134276.0	249
	8q24.13-q24.3	125226.0	145317.5	20091.5	89
57-MM	7q21.11-q21.13	81836.0	88347.6	6511.6	20
58-MM	6p	229.3	33398.4	33169.1	300
59-MM	20q11.22-q11.23	31745.7	36019.8	4274.0	58
60-MM	1p31.3	61262.5	66174.3	4911.8	24
61-MM	21q11.2-q22.3	14557.5	46922.6	32365.1	203
	Xq21.32-q28	93223.7	154094.5	60870.8	363
62-MM	16q12.1-24.3	46475.3	88827.3	42352.0	342
	1q21.3-q44	149629.8	247249.7	97619.9	887
	4q22.1-tel	92795.6	191273.1	98477.4	309
63-MM	10	0.0	135374.7	135374.7	702
	11	142.9	134452.4	134309.5	249
	12p	1307.5	34318.1	33010.5	267
64-MM	12q12-q13.11	38154.4	47316.4	9162.0	46
	14q23.2-q24.1	63159.8	69007.2	5847.5	42
65-MM	10q21.1-22.2	54113.1	72551.9	18438.8	69
	2q31.3-2q32.2	182500.0	191052.0	8552.0	33
66-MM	3p12.3-p14.3	55287.6	78646.8	23359.2	66
	3p24.1-p25.2	11836.4	30675.5	18839.1	69
	3q24-q26.2	148850.8	170945.9	22095.1	84
67-MM	7	0.0	158821.4	158821.4	843
	12p13.31-q24.33	5485.3	132349.5	126864.3	942
	22q11.21-q13.33	16898.3	49691.4	32793.2	400
68-MM	15q22.2-q23	61127.0	66981.0	5854.0	69
	<b>6p21.31-p22.1*</b>	25067.8	36424.9	11357.1	295
69-MM	2q14.2-q14.3	119028.8	128385.5	9356.8	36
	4q34.3-q35.1	178277.8	184341.1	6063.3	8
	<b>5q33.1-33.3*</b>	149337.5	159390.7	10053.3	67
	<b>9p13.3-p21.2*</b>	27274.2	33603.8	6329.7	25
70-MM	14q32.31	100556.7	106368.6	5811.8	55
	20q11.23-q12	32763.7	38459.8	5696.0	59
	2q24.2-q31.1	161074.2	170005.6	8931.4	34
71-MM	13q31.1-32.1	84142.9	94477.4	10334.5	8
	17q11.2-q21.2	27625.6	36900.8	9275.3	164
	18q12.1-21.1	0.0	76117.2	76117.2	33
	8q11.21-q11.23	46944.7	53395.4	6450.6	14
72-MM	2p14-16.1	65090.4	59640.0	5450.0	29
73-MM	<b>1q21.1-q44*</b>	145327.6	249224.4	103896.7	901
74-MM	17	0.0	78774.7	78774.7	1091
	16q12.1-q21	50507.7	58515.7	8008.0	72
	16q21.1-tel	62547.3	73868.9	11321.6	151
	<b>15q23-q25.2*</b>	68846.1	81088.7	12242.5	121



Figure supplementary 3: Summary of copy number neutral LOH (CNN-LOH) and homozygous deletions (HZD) along chromosomes. Lines represent CNN-LOH and arrows mark the HZD position. Code colour: pink identifies MGUS, blue for SMM and green for MM patients. Stars represent copy number gained LOH



## Homozygous deletions (HZD)

Using the smoothing algorithm within dChip, we detected a total of 12 homozygous deletions (HZD), corresponding to four MGUS (25%), one SMM (5%) and three MM (9%) patients. These 12 HZD involved 10 different regions with a median size of 209.7 Kb; eight of them targeted a total of 23 genes including *BIRC2*, *BIRC3*, *YAP1*, *MMP7*, *MMP20* and *PRAME* (Table 6). Even though HZD is not a common alteration, it is worth noting that two pairs of MGUS patients showed the same HZD, one located at 8p11.23-p11.22 (which contained only one known gene, *ADAM3A*) and the other one at 2p22.3. Furthermore, two other MGUS patients displayed two HZD each (Supplementary Figure 2).

**Table 6:** Homozygous deletions in monoclonal gammopathies

<i>Patient</i>	<i>Cytogenetic band</i>	<i>Start (Kb)</i>	<i>End (Kb)</i>	<i>Size (Kb)</i>	<i>Known genes</i>
15_MGUS	1q25.1	173068.5	173063.2	5.3	<i>RABGAP1L</i>
13_MGUS	1q31.1	195077.6	194981.6	96.0	<i>CFHR1</i> , <i>CFHR3</i>
15_MGUS	2p22.3	34590.3	34546.8	43.5	
19_MGUS	2p22.3	34590.6	34549.7	40.9	
66_MM	3q26.1	163626.5	163612.0	14.5	
11_MGUS	6q14.1	79092.9	79020.7	72.3	
9_MGUS	8p11.23-p11.22	39507.6	39350.8	156.8	<i>ADAM3A</i>
19_MGUS	8p11.23-p11.22	39506.4	39354.1	152.3	<i>ADAM3A</i>
56_MM	11q22.1-q22.2	102013.9	101523.2	490.7	<i>TRPC6</i> , <i>ANGPTL5</i> , <i>KIAA1377</i> , <i>C11orf70</i> , <i>YAP1</i> , <i>BIRC3</i> , <i>BIRC2</i> , <i>TMEM123</i> , <i>MMP7</i> , <i>MMP20</i>
40_SMM	13q32.1	94715.6	93912.0	803.6	<i>DCT</i> , <i>TGDS</i> , <i>GPR180</i> , <i>SOX21</i> , <i>ABCC4</i>
74_MM	19q13.31	48434.2	48239.1	195.0	<i>PSG2</i> , <i>PSG5</i> , <i>PSG4</i> , <i>PSG9</i>

## Correlation with fragile sites (FRA)

Based on previous findings suggesting a correlation between FRA and chromosomal regions frequently involved in rearrangements or cancer breakpoints,<sup>21,22</sup> we tried to find a correspondence between them and the genetic lesions detected by SNP array (MCR, focal and recurrent CNA, HZD and interstitial CNN-LOH regions). It is of note that 17 of the 31 (55%) previously described MCR and three of the eight (38%) focal-recurrent CNA coincide, in at least one of the boundaries, with a described FRA. Additionally, taking into account the ten different areas affected by HZD, 40% (1q25.1, 1q31.1, 13q32.1 and 19q13.31)

corresponded to fragile sites. Regarding the CNN-LOH regions, when we considered solely interstitial regions (n=49) we found that 32 of them (65%) were also located inside FRA. Likewise, four of seven CNG-LOH (57%) were within a FRA. It is intriguing that the only two identical interstitial UPD had their start and end within a described FRA. (Supplementary figure 4)

Upon examining the relationship of between the frequency of genetic lesions in fragile sites and the type of monoclonal gammopathy we observed that 68% of MCR in MGUS were located in a reported fragile site, compared with 52% in MM, although these differences were not statistically significant. The same trend was observed in focal-recurrent CNAs (55% in MGUS vs. 25% in MM).

### **Associations between the different genomic imbalances and the relationship with *IGH* translocations**

Regarding associations between chromosomal imbalances, broadly speaking, gains were associated with gains, and losses with losses. The most frequent gains, particularly trisomies of the odd-numbered chromosomes (3, 5, 7, 9, 11, 15 and 19), tended to be associated with each other except for the 1q gains, which were significantly associated with losses (1p, 9p, 13q, 14q, 16q, 20p, 20q, X) but not with gains. Regarding the most frequent losses, 1p loss was only associated with losses (2q, 3p, 4p, 4q, 6q, 8q, 9p, 10q, 12p, 12q, 13q, 14q, 17q, 20p, 22q, Yq). Likewise, X monosomy was associated with losses on chromosomes 13q, 16q, 18p, 18q, and 22q loss with losses on 1p, 2q, 6q, 8p, 12p, 13q. Losses on 13q were mainly associated with chromosomal losses but also with some 1q gains.

When we analyzed the relationship between the *IGH* rearrangements detected by FISH and the CNA described by SNP arrays we found that patients with t(4;14) (n=6) more frequently showed losses on 1p, 4q, 9p, 11q, 12p, 13q, 22q ( $P=0.04$ ).

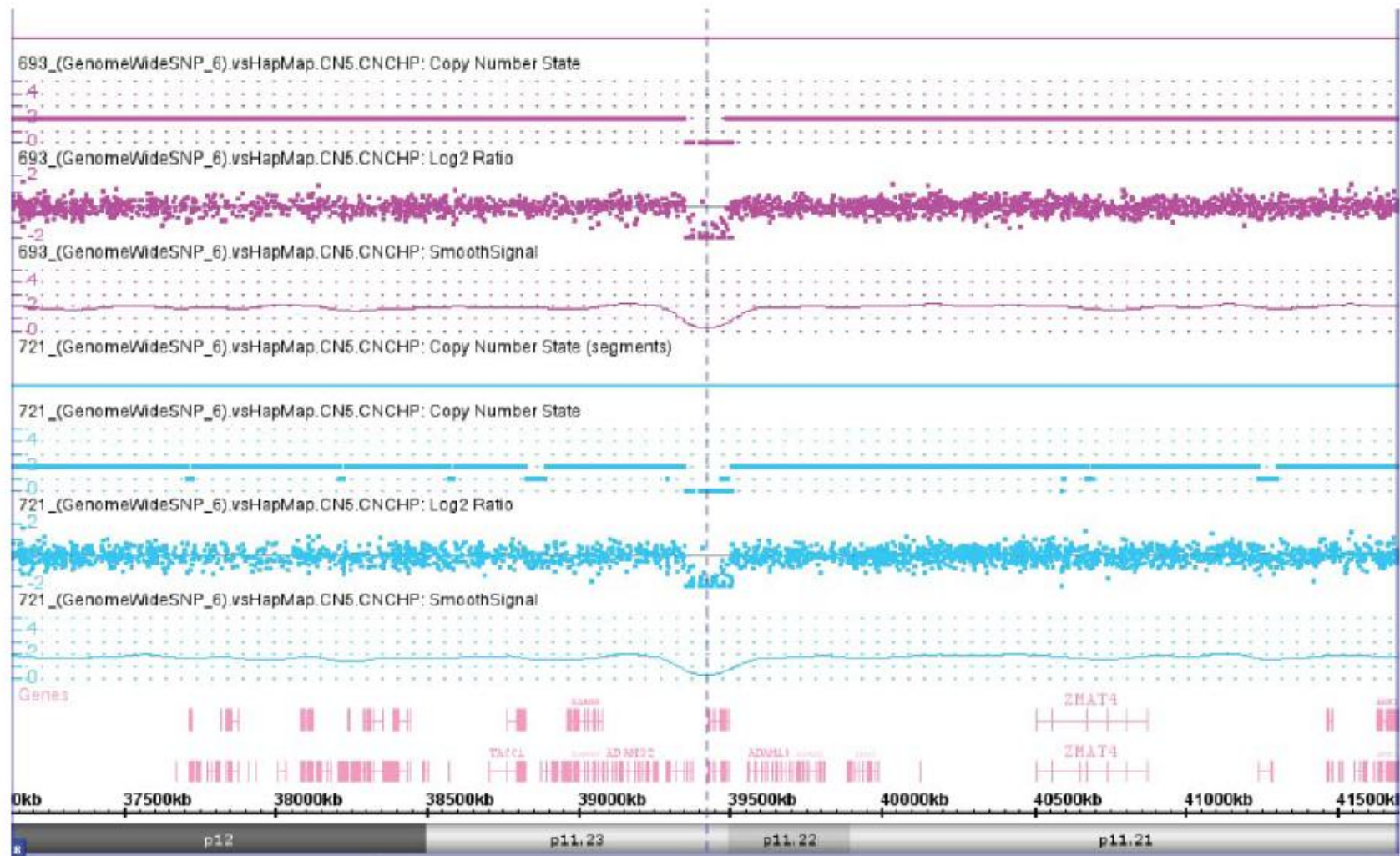


Figure supplementary 2: Homozygous deletion seen at 8p11.23-p11.22 in two patients with MGUS by CHAS software.

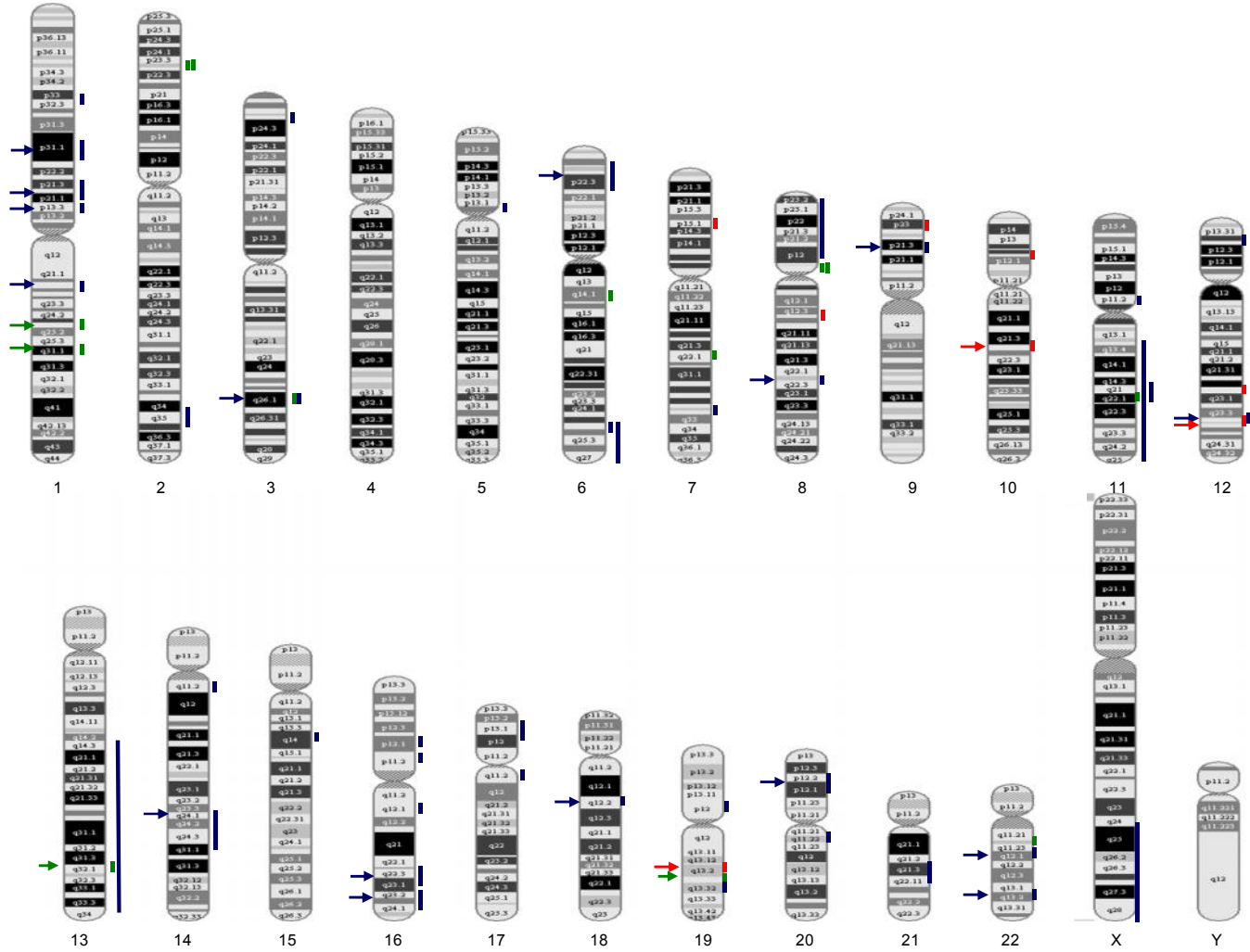


Figure Supplementary 4: Representation of MCR (blue line ), HZD (green line) and focal-recurrent CNA (pink line) and overlapping fragile sites (arrows)

## DISCUSSION

The present study shows for the first time the different copy number and LOH profiles present at three stages of MG evolution: MGUS, SMM and MM. There were significantly more copy number alterations in MM than in MGUS patients, values for SMM being intermediate. This may reflect increased genetic instability as the stage of the disease becomes more advanced. This finding is in line with results from solid tumors and lymphoid neoplasms showing that the average number of copy alterations is correlated with tumor aggressiveness, progression and prognosis.<sup>23-26</sup> Recently a new mechanism of genomic instability called chromothripsis whereby tens to hundreds of genomic rearrangement occur in a localized genomic region, has been described in low proportion of MM.<sup>27</sup> After looking for this phenomenon in our MM series, the hallmarks of chromothripsis were not detected in any cases, probably due to its low frequency. Our results show that chromosomal gains were usually associated with gains, and losses with losses. The only exception to this pattern was 1q gains that were significantly associated with losses, which may help explain the adverse reported outcome of patients with the 1q gain.

When we considered specific abnormalities, we found significant differences between active MM and previous steps of MG. Thus, gains on 1q, 3p, 6p, 9p, 11q, 19, 21q, together with losses on 1p, 16q and 22q were significantly less frequent in MGUS than in MM, suggesting that they may be involved in this evolution. Otherwise, gains on 11p and losses on 4q would be involved in the transition from SMM to symptomatic disease. Cheng *et al* have recently reported by comparative genomic hybridization (CGH) that 4q deletion could be an early potentially critical genetic event in MM tumorigenesis, since CGH arrays analysis detected similar frequencies of this abnormality in MGUS and MM.<sup>28</sup> However, our results do not support this hypothesis since the incidence was higher in MM (20%) than in MGUS and SMM (3%). Likewise we also failed to find a higher frequency of 19 gains in MGUS; in fact, the incidence of trisomy 19 was significantly higher in MM.

We have paid particular attention to those CNA that were apparently exclusive of the late stages of MG (symptomatic MM), since we may speculate that these chromosomal imbalances may be critical to the malignant transformation. However, it is possible that

these aberrations may already be present in subpopulations of PC clones at early stages (MGUS, SMM), but can only be detected by high-resolution techniques. In line with this hypothesis we found that several of these alterations, such as 11q and 21q gains and 16q and 22q deletions, which were apparently only detected in MM samples, were also present in minor subclones of MGUS patients. This finding confirms that most, if not all chromosomal aberrations are already present in the MGUS state, which supports the notion that karyotypic instability is initiated in MGUS. This is in accordance with our recent study which showed that the number of clonal PC with genetic abnormalities detected by FISH increased from MGUS to SMM and to MM, suggesting a clonal expansion of genetically abnormal PC.<sup>12</sup> Whether specific chromosomal changes confer a proliferative advantage on PC for clonal expansion and MGUS-MM transition remains unclear. The analysis of sequential samples from the same individual evolving from MGUS and SMM to active MM is essential to confirm these results. Interestingly, minor altered subclones were significantly more common in MGUS than in MM. A similar finding based on FISH analysis of pathological PC of MGUS had been reported, so the coexistence of several aneuploid clones with diploid PC was typical of MGUS, in contrast to the predominance of one of two major aneuploid clones in MM.<sup>29</sup>

The accurate determination of the MCR of chromosomal alterations is a crucial step in identifying new oncogenes and tumor suppressor genes. We found 31 MCR (nine gained and 22 lost) with no significant differences between the MG stages. Some of these MCR overlapped partially or completely with other regions previously identified in SNP array studies in symptomatic MM, such as loss of 1p31.1, 1p21.1, 6q25.3, 8p12-p23.3, 12p13.2, 14q24.1-q31.1, 16q12.1, and gains at 1q21.3, 6p22.3.<sup>13,14</sup> For example, Leone *et al* described a commonly deleted region at 1p12-p21.1 which includes, the one that we found at 1p13.3.<sup>14</sup> Furthermore, a commonly gained region at 1q21.1-q23.3 described by Walker *et al* also embedded our common gained region at 1q21.3, suggesting that *KCNN3* is a target gene.<sup>13</sup> Some of the genes included in MDR were relevant transcription regulators. For example, 1p21.1-p21.3 region contains genes such as HDAC4, which has a role in cell growth arrest, differentiation and death, FOSL2, a FOS family member, implicated as regulator of cell proliferation, and JUND which has been proposed to protect cells from p53-dependent senescence and apoptosis.<sup>30-33</sup> Similarly, another transcription regulator, CEBPA, located at

MDR 12p13.2 is a critical transcription factor that controls tissue specific gene expression and proliferation arrest.<sup>34</sup> Indeed, CEBPA acts as a tumor suppressor in a number of tumor types.<sup>35</sup> Regarding MM, CEBPA polymorphism has been described in 5% of MM patients.<sup>36</sup> The 8p12-p23.3 MDR contains STAT1, which is a promoter of apoptosis required for interferon-alpha-mediated cell death,<sup>37</sup> and two proapoptotic molecules, TNFRSF10A, which transduces cell death signal and induces cell apoptosis, and BNIP3L that may function as a tumor suppressor.<sup>38-42</sup> On the other hand, the MGR at 8q22.2-q22.3, 16p12.1, 16p11.2, and 20q11.2, and the MDR at 2q35, 11p11.2, 12q24.11 and 14q11.2 detected in our series have not been described before.

The presence of CNN-LOH has been recognized in various hematological malignancies, including acute leukemias, follicular lymphoma, chronic lymphocytic leukemia, mantle cell lymphoma and MM.<sup>13,18,43,44</sup> In our series, multiple regions of CNN-LOH widely scattered throughout the genome were identified, with different distributions in the distinct MG groups. CNN-LOH was found in half of MM patients but only in 25% of patients with MGUS or SMM. This is the first study to compare different types of MG, given that the report by Walker *et al* just focuses on MM, with 37% of the cases showing CNN-LOH.<sup>13</sup> Interestingly, we observed that individual patients tended to accumulate more than one CNN-LOH. In fact, only nine of the 28 patients had only one CNN-LOH. Concordant with previously described data most CNN-LOH were interstitial.<sup>13,45,46</sup> Nevertheless, we also found seven whole chromosomes that were affected by CNN-LOH, which probably arose by mitotic nondisjunction. Regarding the CNG-LOH in MM patients, the one affecting chromosome 1 had been already described.<sup>13,45</sup> Although CNG-LOH is an uncommon finding, we found one CNG-LOH in 1q and four others more distributed on different chromosomes. We also described for the first time CNG-LOH in two MGUS patients.

HZD are important genetic events since the genes contained in the deleted regions are biallelically inactivated. Two of the 12 HZD (11q22.1-q22.2 and 13q32.1) detected in this study had been previously reported by other groups, highlighting their relevance in MM genetics.<sup>47</sup> Some of the genes contained in 11q22.1-q22.2 HZD are known to be involved in cancer. Thus, *BIRC2* and *BIRC3* (11q22 HZD) encode for proteins that inhibit apoptosis and play a role in MM prognosis.<sup>48</sup> Matrix metalloproteases (MMPs 7 and 20) play a central role

in cell proliferation, migration, differentiation, angiogenesis, apoptosis and host defences and YAP1 is the critical downstream regulatory target in the Hippo signaling pathway, playing a pivotal role in organ size control and tumor suppression by restricting proliferation and promoting apoptosis.<sup>49,50</sup> By contrast, the genes contained in the 13q32.1 HZD have not been yet associated with a role in cancer disease. The HZD located at 8p11.23-p11.22 and found in two MGUS patients is also of particular interest since it contains only the *ADAM3A* gene, which its homozygous deletion has recently been reported in pediatric high-grade glioma and diffuse intrinsic pontine gliomas.<sup>51,52</sup> Other relevant genes, such the tumor suppressor gene *PTPRD*, the transcriptional regulators *ZNF709*, *ZNF564* and *ZNF490*, and *UBE2N*, which plays a role in the error-free DNA repair pathway, were included in the reported focal-recurrent CNA.<sup>53,54</sup>

Fragile sites are gaps, constrictions or breaks in metaphase chromosomes that arise when cells are exposed to a perturbation of the DNA replication process.<sup>21,22</sup> To date, around 110 loci have been identified as chromosomal fragile sites (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Locuslink/>). Several studies have shown a strong correlation between the location of common fragile sites and breakpoints on specific chromosomal aberrations from solid tumors such as breast, prostate, lung and esophageal squamous cell carcinoma.<sup>55,56</sup> For example, one of the most frequently observed fragile sites, *FRA16D*, is located at 16q23.2 and is associated with the tumor suppressor *WWOX*, which is significantly underexpressed in MM cases with 16q LOH or t(14;16).<sup>47</sup> In our series, more than one-third of the focal and recurrent CNA and HZD, and more than a half of the MCR and interstitial UPD overlapped with known fragile sites; this raises the possibility that fragile sites may facilitate the emergence of some of these genetic lesions.

A major aim in cancer biology is to understand the full spectrum of gene changes giving rise to tumor initiation and progression. In this context, whole-genome analysis using SNP-mapping arrays reveals evolving cytogenetic profiles of increasing complexity from MGUS to SMM and to MM. However, although MM have more CNA and CNN-LOH than early steps, MGUS are as genetically aberrant as MM, and the transition from MGUS to MM is not associated with a particular chromosomal imbalance, but rather with an expansion of altered clones that are already present in MGUS. In addition, our study shows the enormous



potential of SNP-based arrays for identifying new regions involved in CNA, HZD and CNN-LOH. A comprehensive investigation of the genes contained in these regions may provide new insights into MM pathogenesis.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors thank “Grupo Español de Mieloma” clinicians for providing MM samples and S. González, I. Rodríguez, I. Isidro, T. Prieto y V. Gutierrez for technical assistance.

## REFERENCES

- (1) Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM, Katzmann JA, Caporaso NE, Hayes RB, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood* 2009 May 28; **113**: 5412-7.
- (2) Weiss BM, Abadie J, Verma P, Howard RS, Kuehl WM. A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients. *Blood* 2009 May 28; **113**: 5418-22.
- (3) Kyle RA, Greipp PR. Smoldering multiple myeloma. *N Engl J Med* 1980 Jun 12; **302**: 1347-9.
- (4) Perez-Persona E, Vidriales MB, Mateo G, Garcia-Sanz R, Mateos MV, de Coca AG, et al. New criteria to identify risk of progression in monoclonal gammopathy of uncertain significance and smoldering multiple myeloma based on multiparameter flow cytometry analysis of bone marrow plasma cells. *Blood* 2007 Oct 1; **110**: 2586-92.
- (5) Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Offord JR, Larson DR, Plevak MF, et al. A Long-Term Study of Prognosis in Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *N Engl J Med* 2002 Feb 21; **346**: 564-9.
- (6) Kyle RA, Remstein ED, Therneau TM, Dispenzieri A, Kurtin PJ, Hodnefield JM, et al. Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *N Engl J Med* 2007 Jun 21; **356**: 2582-90.
- (7) Davies FE, Dring AM, Li C, Rawstron AC, Shamma MA, O'Connor SM, et al. Insights into the multistep transformation of MGUS to myeloma using microarray expression analysis. *Blood* 2003 Dec 15; **102**: 4504-11.
- (8) Hallek M, Bergsagel PL, Anderson KC. Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood* 1998 Jan 1; **91**: 3-21.

- (9) Avet-Loiseau H, Li JY, Morineau N, Facon T, Brigaudeau C, Harousseau JL, et al. Monosomy 13 Is Associated With the Transition of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance to Multiple Myeloma. *Blood* 1999 Oct 15; **94**: 2583-9.
- (10) Fonseca R, Bailey RJ, Ahmann GJ, Rajkumar SV, Hoyer JD, Lust A, et al. Genomic abnormalities in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 2002 Jul 30; **100**: 1417-24.
- (11) Kaufmann H, Ackermann J, Baldia C, Nosslinger T, Wieser R, Seidl S, et al. Both IGH translocations and chromosome 13q deletions are early events in monoclonal gammopathy of undetermined significance and do not evolve during transition to multiple myeloma. *Leukemia* 2004 Sep 23; **18**: 1879-82.
- (12) Lopez-Corral L, Gutierrez NC, Vidriales MB, Mateos MV, Rasillo A, Garcia-Sanz R, et al. The progression from MGUS to smoldering myeloma and eventually to multiple myeloma involves a clonal expansion of genetically abnormal plasma cells. *Clin Cancer Res* 2011 Apr 1; **17**: 1692-700.
- (13) Walker BA, Leone PE, Chiecchio L, Dickens NJ, Jenner MW, Boyd KD, et al. A compendium of myeloma-associated chromosomal copy number abnormalities and their prognostic value. *Blood* 2010 Oct 14; **116**: e56-e65.
- (14) Leone PE, Walker BA, Jenner MW, Chiecchio L, Dagrada G, Protheroe RK, et al. Deletions of CDKN2C in multiple myeloma: biological and clinical implications. *Clin Cancer Res* 2008 Oct 1; **14**: 6033-41.
- (15) Chapman MA, Lawrence MS, Keats JJ, Cibulskis K, Sougnez C, Schinzel AC, et al. Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature* 2011 Mar 24; **471**: 467-72.
- (16) IMWG. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working

Group. *British Journal of Haematology* 121 (5), 749-757. 2010.

Ref Type: Generic

- (17) Zhang J, Feuk L, Duggan GE, Khaja R, Scherer SW. Development of bioinformatics resources for display and analysis of copy number and other structural variants in the human genome. *Cytogenet Genome Res* 2006; **115**: 205-14.
- (18) Pfeifer D, Pantic M, Skatulla I, Rawluk J, Kreutz C, Martens UM, et al. Genome-wide analysis of DNA copy number changes and LOH in CLL using high-density SNP arrays. *Blood* 2007 Feb 1; **109**: 1202-10.
- (19) Kearney HM, Thorland EC, Brown KK, Quintero-Rivera F, South ST. American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. *Genet Med* 2011 Jul; **13**: 680-5.
- (20) Gutierrez NC, Castellanos MV, Martin ML, Mateos MV, Hernandez JM, Fernandez M, et al. Prognostic and biological implications of genetic abnormalities in multiple myeloma undergoing autologous stem cell transplantation: t(4;14) is the most relevant adverse prognostic factor, whereas RB deletion as a unique abnormality is not associated with adverse prognosis. *Leukemia* 2007 Jan; **21**: 143-50.
- (21) Debacker K, Kooy RF. Fragile sites and human disease. *Hum Mol Genet* 2007 Oct 15; **16 Spec No. 2**: R150-R158.
- (22) Dillon LW, Burrow AA, Wang YH. DNA instability at chromosomal fragile sites in cancer. *Curr Genomics* 2010 Aug; **11**: 326-37.
- (23) Bea S, Ribas M, Hernandez JM, Bosch F, Pinyol M, Hernandez L, et al. Increased number of chromosomal imbalances and high-level DNA amplifications in mantle cell lymphoma are associated with blastoid variants. *Blood* 1999 Jun 15; **93**: 4365-74.

- (24) Monni O, Oinonen R, Elonen E, Franssila K, Teerenhovi L, Joensuu H, et al. Gain of 3q and deletion of 11q22 are frequent aberrations in mantle cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1998 Apr; **21**: 298-307.
- (25) Knuutila S, Autio K, Aalto Y. Online access to CGH data of DNA sequence copy number changes. *Am J Pathol* 2000 Aug; **157**: 689.
- (26) Ried T, Heselmeyer-Haddad K, Blegen H, Schrock E, Auer G. Genomic changes defining the genesis, progression, and malignancy potential in solid human tumors: a phenotype/genotype correlation. *Genes Chromosomes Cancer* 1999 Jul; **25**: 195-204.
- (27) Magrangeas F, vet-Loiseau H, Munshi NC, Minvielle S. Chromothripsis identifies a rare and aggressive entity among newly diagnosed multiple myeloma patients. *Blood* 2011 May 31.
- (28) Cheng SH, Ng MH, Lau KM, Liu HS, Chan JC, Hui AB, et al. 4q loss is potentially an important genetic event in MM tumorigenesis: identification of a tumor suppressor gene regulated by promoter methylation at 4q13.3, platelet factor 4. *Blood* 2007 Mar 1; **109**: 2089-99.
- (29) Rasillo A, Tabernero MD, Sanchez ML, Perez de AM, Martin AM, Hernandez J, et al. Fluorescence in situ hybridization analysis of aneuploidization patterns in monoclonal gammopathy of undetermined significance versus multiple myeloma and plasma cell leukemia. *Cancer* 2003 Feb 1; **97**: 601-9.
- (30) Bozec A, Bakiri L, Hoebertz A, Eferl R, Schilling AF, Komnenovic V, et al. Osteoclast size is controlled by Fra-2 through LIF/LIF-receptor signalling and hypoxia. *Nature* 2008 Jul 10; **454**: 221-5.
- (31) Geng H, Harvey CT, Pittsenbarger J, Liu Q, Beer TM, Xue C, et al. HDAC4 protein regulates HIF1alpha protein lysine acetylation and cancer cell response to hypoxia. *J Biol Chem* 2011 Nov 4; **286**: 38095-102.

- (32) Mathas S, Kreher S, Meaburn KJ, Johrens K, Lamprecht B, Assaf C, et al. Gene deregulation and spatial genome reorganization near breakpoints prior to formation of translocations in anaplastic large cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009 Apr 7; **106**: 5831-6.
- (33) Weitzman JB, Fiette L, Matsuo K, Yaniv M. JunD protects cells from p53-dependent senescence and apoptosis. *Mol Cell* 2000 Nov; **6**: 1109-19.
- (34) Schepers H, Wierenga AT, van GD, Eggen BJ, Vellenga E, Schuringa JJ. Reintroduction of C/EBPalpha in leukemic CD34+ stem/progenitor cells impairs self-renewal and partially restores myelopoiesis. *Blood* 2007 Aug 15; **110**: 1317-25.
- (35) Thoennissen NH, Thoennissen GB, Abbassi S, Nabavi-Nouis S, Sauer T, Doan NB, et al. Transcription factor CCAAT/enhancer-binding protein alpha and critical circadian clock downstream target gene PER2 are highly deregulated in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2012 Feb 21.
- (36) Fuchs O, Provaznikova D, Kocova M, KostECKA A, Cvekova P, Neuwirtova R, et al. CEBPA polymorphisms and mutations in patients with acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndrome, multiple myeloma and non-Hodgkin's lymphoma. *Blood Cells Mol Dis* 2008 May; **40**: 401-5.
- (37) Rossi EA, Rossi DL, Cardillo TM, Stein R, Goldenberg DM, Chang CH. Preclinical studies on targeted delivery of multiple IFNalpha2b to HLA-DR in diverse hematologic cancers. *Blood* 2011 Aug 18; **118**: 1877-84.
- (38) Cheng I, Levin AM, Tai YC, Plummer S, Chen GK, Neslund-Dudas C, et al. Copy number alterations in prostate tumors and disease aggressiveness. *Genes Chromosomes Cancer* 2012 Jan; **51**: 66-76.
- (39) Johnstone RW, Frew AJ, Smyth MJ. The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy. *Nat Rev Cancer* 2008 Oct; **8**: 782-98.

- (40) Jourdan M, Reme T, Goldschmidt H, Fiol G, Pantesco V, De VJ, et al. Gene expression of anti- and pro-apoptotic proteins in malignant and normal plasma cells. *Br J Haematol* 2009 Apr; **145**: 45-58.
- (41) Ripperger T, von NN, Kamphues K, Emura M, Lehmann U, Tauscher M, et al. Promoter methylation of PARG1, a novel candidate tumor suppressor gene in mantle-cell lymphomas. *Haematologica* 2007 Apr; **92**: 460-8.
- (42) Wu X, Shi J, Wu Y, Tao Y, Hou J, Meng X, et al. Arsenic trioxide-mediated growth inhibition of myeloma cells is associated with an extrinsic or intrinsic signaling pathway through activation of TRAIL or TRAIL receptor 2. *Cancer Biol Ther* 2010 Dec 1; **10**: 1201-14.
- (43) Leich E, Salaverria I, Bea S, Zettl A, Wright G, Moreno V, et al. Follicular lymphomas with and without translocation t(14;18) differ in gene expression profiles and genetic alterations. *Blood* 2009 Jul 23; **114**: 826-34.
- (44) Hartmann EM, Campo E, Wright G, Lenz G, Salaverria I, Jares P, et al. Pathway discovery in mantle cell lymphoma by integrated analysis of high-resolution gene expression and copy number profiling. *Blood* 2010 Aug 12; **116**: 953-61.
- (45) Walker BA, Leone PE, Jenner MW, Li C, Gonzalez D, Johnson DC, et al. Integration of global SNP-based mapping and expression arrays reveals key regions, mechanisms, and genes important in the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood* 2006 Sep 1; **108**: 1733-43.
- (46) Walker BA, Morgan GJ. Use of single nucleotide polymorphism-based mapping arrays to detect copy number changes and loss of heterozygosity in multiple myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma* 2006 Nov; **7**: 186-91.
- (47) Dickens NJ, Walker BA, Leone PE, Johnson DC, Brito JL, Zeisig A, et al. Homozygous deletion mapping in myeloma samples identifies genes and an expression signature relevant to pathogenesis and outcome. *Clin Cancer Res* 2010 Mar 15; **16**: 1856-64.

- (48) Keats JJ, Fonseca R, Chesi M, Schop R, Baker A, Chng WJ, et al. Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma. *Cancer Cell* 2007 Aug; **12**: 131-44.
- (49) Remy L, Trespeuch C. [Matrilysin-1 and cancer pathology]. *Med Sci (Paris)* 2005 May; **21**: 498-502.
- (50) Orr BA, Bai H, Odia Y, Jain D, Anders RA, Eberhart CG. Yes-associated protein 1 is widely expressed in human brain tumors and promotes glioblastoma growth. *J Neuropathol Exp Neurol* 2011 Jul; **70**: 568-77.
- (51) Barrow J, mowicz-Brice M, Cartmill M, MacArthur D, Lowe J, Robson K, et al. Homozygous loss of ADAM3A revealed by genome-wide analysis of pediatric high-grade glioma and diffuse intrinsic pontine gliomas. *Neuro Oncol* 2011 Feb; **13**: 212-22.
- (52) Epping MT, Wang L, Edel MJ, Carlee L, Hernandez M, Bernards R. The human tumor antigen PRAME is a dominant repressor of retinoic acid receptor signaling. *Cell* 2005 Sep 23; **122**: 835-47.
- (53) Laczmanska I, Sasiadek MM. Tyrosine phosphatases as a superfamily of tumor suppressors in colorectal cancer. *Acta Biochim Pol* 2011; **58**: 467-70.
- (54) Nakada S, Tai I, Panier S, Al-Hakim A, Iemura S, Juang YC, et al. Non-canonical inhibition of DNA damage-dependent ubiquitination by OTUB1. *Nature* 2010 Aug 19; **466**: 941-6.
- (55) Glover TW. Common fragile sites. *Cancer Lett* 2006 Jan 28; **232**: 4-12.
- (56) O'Keefe LV, Richards RI. Common chromosomal fragile sites and cancer: focus on FRA16D. *Cancer Lett* 2006 Jan 28; **232**: 37-47.





## **Capítulo 3:**

### **Global gene expression profiling in the study of the multistep transformation in MM: from MGUS to myeloma status.**

Lucía López-Corral, Luis Antonio Corchete, María Victoria Mateos, Ramón García-Sanz, Eva M. García, Juan-José Lahuerta, Joan Bladé, Albert Oriol, María Luz Martino, Ana Isabel Teruel, José Hernández, Jesús María Hernández-Rivas, Jesús F. San Miguel, Norma C. Gutiérrez.

*Manuscrito en preparación.*

## **Análisis del perfil de expresión génica en las gammapatías monoclonales: de la GMSI al Mieloma Múltiple pasando por el Mieloma Múltiple Quiescente.**

**Fundamento:** Tanto la GMSI como el MM quiescente (MMQ) se consideran entidades premalignas y asintomáticas con capacidad de evolucionar a MM sintomático. A pesar de su comportamiento clínico radicalmente distinto las 3 entidades comparten la misma célula neoplásica, que es una célula plasmática (CP) clonal y aberrante. Con el fin de averiguar si las tecnologías genómicas de alta resolución son capaces de establecer diferencias y desentrañar nuevos mecanismos patogénicos en la historia natural de progresión en etapas de las gammapatías monoclonales (GM) se llevó a cabo un análisis de expresión génica en los diferentes estadios de las GM.

**Métodos:** Se estudiaron los perfiles de expresión génica (GEP) mediante el array Human Gene 1.0 ST de 102 GM al diagnóstico integradas por 43 MM, 33 MMQ de alto riesgo (MMQ-AR) y 26 GMSI. Además se analizó la MO de 5 sujetos sanos.

**Resultados:** Se observó una desregulación de 126 genes (20 sobreexpresados y 106 infraexpresados) al comparar las CP de las GM con las de sujetos sanos. Entre ellos se encontraban genes tan relevantes como *Bcl2L1*, *IRF2*, *RAB6C*, *LIMD1*, *CABLES1*, *SKP1*, *TMSB10* o diferentes *ZNF*. Cuando se comparó la GMSI con las entidades mielomatosas, se detectaron 1184 genes comunes desregulados (542 sobreexpresados y 642 infraexpresados). Entre ellos destacaban *BAG3*, *MMP8*, *SYK*, *APAF1*, *RELA*, *IFITM1*, *CCNB1IP1*, *CD274*, *DPP9*. De igual forma que la frecuencia de determinadas alteraciones citogenéticas aumenta de forma progresiva y significativa en estadios evolutivos avanzados, se encontraron genes cuyo aumento o descenso de expresión era gradual y significativo de GMSI a MMQ-AR y a MM, entre los que se incluían varios genes *SNORD*, *APAF1*, *MEGF9* y *VCAN* ( $P < 0.0001$  entre GMSI vs MMQ-AR y MMQ-AR vs MGUS).

**Conclusiones:** Las tecnologías genómicas modernas de alta resolución permiten establecer diferencias entre GMSI, MMQ-AR y MM que pueden ser las responsables de la progresión de una entidad a otra.

## INTRODUCTION

Multiple myeloma (MM) is a plasma cell malignancy characterized by high genetic complexity<sup>1</sup>. The development of high-throughput methodologist for genomic analysis has greatly incorporated our understanding of the pathogenesis of MM. Thus, these techniques show that genetic heterogeneity ultimately results in different gene expression profiles specific to singular genetic abnormalities. For example, the recurrent *IGH* translocations, the most frequent gains and losses as well as the hyperdiploid and non-hyperdiploid categories display specific expression signatures.

Based on clinical and biological data a multistep model of disease progression beginning in MGUS proceeding through MM, sometimes with an intermediate entity called smoldering MM (SMM), and ending in extramedullary disease, has been proposed<sup>2-7</sup>.

Cytogenetic studies using fluorescence *in situ* hybridization analyses (FISH) and more sophisticated genomic technologies such as SNP-based mapping arrays and whole genome sequencing have provided a framework of the recurrent chromosomal abnormalities associated with the stages MM and highlighted that most genetic lesions typical of MM are already present in MGUS stage<sup>8-13</sup>. We have recently showed that a major difference among these three entities is the number of clonal PC with genetic abnormalities that increases from MGUS to SMM and to MM, suggesting a clonal expansion of genetically abnormal PC<sup>14,15</sup>.

GEP has been also used for identifying genes deregulated in the transition from normal plasma cells (NPC) to MGUS and MM<sup>4,16-18</sup>. The number of genes differentially expressed between NPC and MGUS is significantly higher than those deregulated between MGUS and MM<sup>4,17</sup>. Regarding SMM, there has been no attempt to define an expression signature able to discriminate asymptomatic and symptomatic MM. Although based on a limited number of MGUS samples, the studies on this subject show several genes that were differentially expressed in comparisons of NPC and of MGUS and MM, leading to the identification of MGUS with features of MM and of MM with features of MGUS<sup>18</sup>.

Probably, the diffuse limit between established criteria for differentiate MGUS, SMM and MM hamper the distinction of characteristic expression patterns of the multistep transformation process.

Our aim was to gain further insights into the role of the transcriptome deregulation in the transition form a NPC to a clonal PC able to generate a malignant disease like MM or on the contrary, able to remain indolent for a variable period of time like MGUS and SMM. Additionally, a common expression signature for clonal PC irrespective of the evolution step was defined.

## MATERIALS AND METHODS

### **Patients:**

Bone marrow (BM) samples were obtained from patients with MGUS (n=26), high-risk SMM (33) and newly diagnosed MM (n=43), according to the International Myeloma Working Group criteria<sup>19</sup>. All samples corresponded to newly diagnosed untreated patients. In addition, five healthy donors were also included in order to relate the deregulation of gene expression profiling of clonal populations to normal condition. High-risk SMM was defined as the presence of >10% PC in bone marrow (BM) and a monoclonal component IgG  $\geq 3$  g/dL, IgA  $\geq 2$  g/dL or Bence Jones proteinuria  $\geq 1$  g/24h together with absence of CRAB (Calcium increase, Renal Insufficiency, Anemia, Bone lesions)<sup>20</sup>. Patients meeting either but not both of these two criteria were also included in the study if they met the additional criteria of having  $\geq 95\%$  phenotypically aberrant PC in the BM PC compartment (aPC/BMPC) and immunoparesis<sup>21</sup>.

The study was approved by the research ethics committees of all participating centers and written informed consent was obtained from all patients in accordance with the Helsinki Declaration. The main clinical and laboratory characteristics of these patients are shown in Supplementary Table 1.

### **Sample preparation:**

CD138-positive PC isolation was carried out using the AutoMACs separation system (Miltenyi-Biotec, Auburn, CA, USA) in all the BM samples. Final purity was >95% in all MM and SMM cases, and >90% in MGUS patients and healthy donors. Total RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit according to manufacturer's instructions. The RNA integrity was assessed using Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent).

### **Microarrays hybridization:**

RNA labeling and microarray hybridization to Human Gene 1.0 ST Array (Affymetrix) have been previously reported<sup>22</sup>. Full microarray data are available at the Gene Expression Omnibus ([www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/), accession number GSE16558).

### **Gene expression data analysis:**

#### Data pre-processing:

Normalization was carried out by using the expression console (Affymetrix) with RMA algorithm. Since myeloid contamination signature is detected even in samples with high purity, those probes identifying genes exclusive of myeloid lineage were subtracted from the analysis

(Supplementary Table 1). In addition, all those probes whose expression intensity (log<sub>2</sub>) was lower than 6.6 in 95 of 99 samples, as well as those showing minimal variation across all samples (maximum-minimum log<sub>2</sub> variation <2.5) were filtered out. Subsequently, the resulting complete gene set was introduced in a multivariable matrix where each of the four cell states (normal PC, MGUS PC, SMM PC y MM PC) were added to perform the differential expression analyses (see below).

Unsupervised cluster analysis: In order to classify the sample, multidimensional scaling method (MDS) implemented with SIMFIT statistical package (version 6.4.1, available at <http://www.simfit.manchester.ac.uk>) was performed using Euclidean distance.

Supervised analysis: Significant Analysis of Microarrays (SAM) algorithm<sup>23</sup> was used to identify genes with statistically significant changes in expression between different classes. Two programs were used: a free available program <http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM> and R platform (Siggenes library). All data were permuted over 100 cycles by using the two-class (unpaired) and multiclass response format, without considering equal variances. Significant genes were selected based on the lowest false discovery ratio (FDR was 0% in all the class comparisons) and controlling the q-value for the gene list.

Gene function analysis: The probe sets were functionally annotated and grouped according to their biological function using Gene Ontology biological process descriptions. The functional analysis to identify the most relevant biological mechanisms, pathways and functional categories in the data sets of genes selected by statistical analysis, was generated through the use of Gene Set Enrichment analysis (GSEA) and Ingenuity program.

## RESULTS AND DISCUSSION

In an attempt to delineate genes associated with malignant transformation of normal PC to monoclonal gammopathies (MGUS, SMM y MM), we compared gene expression profiles of human BMPC of healthy donors (NPC controls; n=5) and BMPC of patients with plasma cell dyscrasias (MGUS, n=26; SMM, n=33; MM, n=43).

Initially, we investigated whether the selected PC populations from healthy donors, MGUS, SMM and MM patients displayed specific expression profiles that were clearly distinguishable from each other. In an initial approach of the gene expression data set (13060 probes), we explored the separation of the samples into clusters based on similarities in gene expression by using multidimensional scaling method (MDS). Despite there was not a clearly defined line division, MGUS, SMM y MM samples were located into quite well defined groups. Interestingly, the normal samples were mixed with the MGUS samples (Figure 1 and 2).

Next step we carried out the supervised analysis, and re-classify the samples by using MDS with the 2971 probes selected by SAM (Figure 3 and 4). A clearly defined line division could be observed between MGUS, SMM and MM patients.

Subsequently, we investigated the transcriptome signature of clonal PC related to normal status.

### **Expression signature of clonal PC**

The analysis showed that malignant PCs could be differentiated from normal PCs. Thus, we identified a set of 126 common genes differentially expressed in MGUS, SMM and MM in compared with normal PC (q value =0), the majority of them (106 genes) down-regulated in clonal PC (Supplementary table 2).

When we looked at the top ten up-regulated and down-regulated genes, we found important genes involved in cancer pathogenesis. The most significant underexpressed gene was *CABLES1* (Fold Change of -7.45), which is a cyclin-dependent kinase (CDK)-binding protein that plays an inhibitor role in proliferation and/or differentiation and its loss of expression has been found in many human cancers. Other notable genes in the down-regulated list included several transcription factors important in governing the response to growth factor signaling such as *ZNF652* (FC: -6.25) and *GTF2A1* (FC: -6.27). *GADD45A*, with a FC of 6.19, was the most significant up-regulated gene in plasma cell dyscrasias. The protein encoded by this gene responds to environmental stresses by mediating activation of the p38/JNK pathway via MTK1/MEKK4 kinase. The DNA damage-induced transcription of this gene is mediated by both p53-dependent and -independent mechanisms. It has been described to have functions as a



promoter or suppressor of breast cancer dependent on the oncogenic stress and in the response of hematopoietic cells to genotoxic stress. In this setting it has been shown to be anti-apoptotic gene that increases the survival of hematopoietic cells following exposure to UV radiation and certain anticancer drugs. On the other hand, it is of note that five (*RPS28*, FC: 6.13; *RPS10*, FC: 6.04; *RPS17*, FC: 5.69; *RPS12*, FC: 4.93; *RPS27A*, FC: 4.75) of the 10 most significant genes belonged to ribosomal proteins family. In this setting, variable expression of *RPS10* has been reported in colorectal and hepatocellular carcinomas and it is commonly mutated in Diamond-Blackfan anemia. *TMSB10* (FC: 6.14) gene was also noted to be up-regulated, and it has been shown to be associated with tumor progression and metastasis in several cancers through JNK activation.

The progression of MM as a hypoproliferative tumor is thought to be linked to a defect in programmed cell death rather than rapid cell replication. In fact, further analysis of these 126 genes derived INGENUITY showed that the most frequent significant molecular and cellular functional categories were those related with cell cycle (*ATF2*, *GADD45A*, *CDC6* and *IL-16*) and cell death (*BCL2L1*, *CD81*, *CDC6*, *IGHM*, *ABCC1*, *ATF2*, *ATXN2*). The altered expression of these genes may be responsible for the typically low proliferation indices seen in MM. Thus, *GADD45A* and *ATF2* genes are involved in growth arrest, while *BCL2L1*, which belongs to the BCL-2 protein family and acts as an apoptotic activator, is down-regulated in monoclonal gammopathies disease.

On the other hand, largest top canonical pathway identified by INGENUITY analysis program were EIF2 signaling, Regulation of EIF4 and p70S6K Signaling and mTOR signaling. EIF2 and EIF4 play critical roles in translational regulation, while mTOR pathway integrates multiple signals reflecting the availability of growth factors, nutrients, or energy to promote either cellular growth when conditions are favorable or catabolic processes during stress or when conditions are unfavorable. Aberrant mTOR signaling is involved in many disease states including cancer. They contained 17, 8 and 8 differentially expressed genes respectively, and interestingly, all of them belonged to ribosomal protein family.

When we looked for other relevant pathways involved it is of note that there were several IL signaling. In addition, B Cell development, Glucocorticoid Receptor Signaling, G2/M DNA damage checkpoint regulation, ATM signaling, ERK5 signaling, VEGF signaling, P53 signaling and SAPK/JNK signaling were also in the top canonical pathways. Moreover, mitochondrial dysfunction in monoclonal gammopathies was observed. In this setting, *NDUFA6* and *NDUFB8* are overexpressed. Regarding the literature, genes involved in mitochondrial energy metabolism has been described to play a role in sensitivity and resistance to antitumor agents.

Interestingly, 15 of the 126 significant differentially expressed genes were small nucleolar RNA molecules (snoRNA). These non-coding RNAs (ncRNA), although less well known than other ncRNAs, such as miRNAs and siRNAs, could be actively involved in the development of cancer. In addition, the zinc finger proteins are a family of transcription factors important in governing the response to growth factor signaling, and there were 9 of these molecules in the comparison between healthy PC and monoclonal gammopathies PC, all of them down-regulated.

### **Genes differentially expressed between MGUS and MM**

Our next step was to focus on those genes that characterize the opposite: the more indolent and the more aggressive form of monoclonal gammopathy. MGUS PCs and MM PCs represent the extremes of benign and malignant PCs, and their PC GEP signatures are consistent with this extreme divergence.

A statistical analysis showed that 1184 genes distinguished MM from MGUS PCs (*642 genes were downregulated in MM and 542 were upregulated*) from a total of 10397 were included by INGENUITY analysis in relevant pathways.

In this setting, the most significant molecular and cellular function was cell death with 106 genes involved. Thus, there is a high imbalance in the apoptosis level in MM. For example, survival factors such as platelet-derived growth factor (PDGF), epidermal growth factor (EGF) or insulin and insulin-like growth factor I (IGF-I), can suppress apoptosis by activating the serine/threonine kinases *AKT1* and *AKT2*, which are overexpressed in MM respect to MGUS. In fact, (PI3K)/Akt pathway has been reported to contribute to the malignant growth of MM. The up-regulation of *BAG3* and *GADD45B* in MM also contribute to the antiapoptotic state of this disease. Moreover, *APAF1* (one of the most downregulated genes with a FC of 6.9) and *BCL2L1*, which are apoptotic activator, are downregulated in myeloma disease.

On the other hand, EIF2, INOS and IL signaling were the outstanding canonical pathways affected. Again, it must be said that IL-8 IL-17A, IL-6, IL-15 were also significant routes, together with FLT3, Angiopoietin and TREM1 signaling, among others. In addition, PPAR, NFKB and mitochondrial dysfunction were also catalogued as highly significant deregulated pathways, together P53 and G2/M DNA damage and checkpoint regulation pathways.

When we looked for the most down and up regulated genes we found genes as important as *OLR1*, *VCAN* and *TERC*. *OLR1* (FC= -7.21) encodes a low density lipoprotein receptor that belongs to the C-type lectin superfamily. This gene is regulated through the cyclic AMP signaling pathway and it may be involved in the regulation of Fas-induced apoptosis. *VCAN* (FC: -6.87) is a member of the aggrecan/versican proteoglycan family and it is involved in

cell adhesion, proliferation, proliferation, migration and angiogenesis, playing a central role in tissue morphogenesis and maintenance. On the other hand, Telomerase (*TERC*) is a ribonucleoprotein polymerase that maintains telomere ends by addition of the telomere repeat TTAGGG. Telomerase expression plays a role in cellular senescence, as it is normally repressed in postnatal somatic cells resulting in progressive shortening of telomeres, and deregulation of telomerase expression in somatic cells may be involved in oncogenesis. Regarding plasma cell dyscrasias it has been reported that MGUS exhibit normal levels of telomerase activity in their PC, while the majority of MM and PCL express high levels of telomerase activity. In fact, it has been said that this finding indicate that MGUS cells may not be immortalized and that activation of telomerase plays a role in the malignant transformation from MGUS to MM. It is in agreement with the fact that MM disease shows an overexpression of *TERC* (FC: 6.86) in comparison to MGUS samples.

#### **Genes differentially expressed between SMM and MM**

We also wanted to investigate the GEP differences between the smoldering and active states of myeloma disease. 1163 genes from a total of 10904 were significantly deregulated (*936 genes were downregulated in MM and 227 were upregulated*).

The underlying basis of the transition from asymptomatic to symptomatic disease may be understood more clearly by looking at the functional classes of the genes altered. Cancer route was the most important biofunctional pathway, with 17 genes involved, such as *ROCK2*, whose dysfunction has been suggested to be involved in the tumorigenesis of breast cancer, and *PTPRC*, which encodes for a signaling molecule that regulates cell growth, differentiation, mitotic cycle and oncogenic transformation.

In addition, telomere extension by telomerase was one of the most important canonical pathways. Unlimited replicative potential and widespread genomic disarray are among the most common characteristics exhibited by human cancer cells. Although several distinct molecular pathways regulate specific aspects of each of these phenotypes, specialized chromosomal terminal structures, termed telomeres act as essential regulators of both cell life span and chromosomal integrity. Telomeres are dynamic DNA-protein complexes that cap the ends of linear chromosomes, preventing detrimental chromosome rearrangements and defending against genomic instability and the associated risk of cancer. It must be also emphasized Myc mediated apoptosis signaling, which is frequently associated with human malignancies including MM and it involves genes as important as the proapoptotic *BAD*, the

adapter molecule for the death receptor family *FADD* and *caspase 8*, among others. Insulin receptor signaling, IGF1 signaling, EGF signaling, PDGF signaling, P53, NF- $\kappa$ B, TGF $\beta$  signaling and Jak/stat signaling also were included in the pathway list differentiating MM from SMM disease.

On the other hand, when we looked for the most down and up regulated genes we found genes as important as *TPI1* and *BAD*.

### **Genes with progressive up or downregulation from MGUS to SMM and to MM**

We therefore reasoned that genes progressively and significantly deregulated from MGUS to SMM and to MM would constitute the best possible correlation of a monoclonal gammopathies signature of deregulated genes promoting multistep transformation.

Interestingly, only eight out of the 2971 significant genes exhibited a progressive deregulation in the evolving stages of monoclonal gammopathies. Surprisingly, all the genes with a progressively increase from MGUS to SMM and to MM were small nucleolar RNA genes (snRNA) (Figure 8). In addition, only three outstanding genes, *APAF1*, *VCAN* and *MEGF9* showed a progressive downregulation in the transition from MGUS to SMM and to MM (Figure 9).

## REFERENCES

1. Palumbo A, Anderson K. Multiple myeloma. *N.Engl.J.Med.* 2011;364:1046-1060.
2. Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood* 2009;113:5412-5417.
3. Weiss BM, Abadie J, Verma P, Howard RS, Kuehl WM. A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients. *Blood* 2009;113:5418-5422.
4. Davies FE, Dring AM, Li C et al. Insights into the multistep transformation of MGUS to myeloma using microarray expression analysis. *Blood* 2003;102:4504-4511.
5. Hallek M, Leif Bergsagel P, Anderson KC. Multiple Myeloma: Increasing Evidence for a Multistep Transformation Process. *Blood* 1998;91:3-21.
6. Hideshima T, Bergsagel PL, Kuehl WM, Anderson KC. Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. *Blood* 2004;104:607-618.
7. Kuehl WM, Bergsagel PL. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat.Rev.Cancer* 2002;2:175-187.
8. Avet-Loiseau H, Li JY, Morineau N et al. Monosomy 13 Is Associated With the Transition of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance to Multiple Myeloma. *Blood* 1999;94:2583-2589.
9. Avet-Loiseau H, Facon T, Grosbois B et al. Oncogenesis of multiple myeloma: 14q32 and 13q chromosomal abnormalities are not randomly distributed, but correlate with natural history, immunological features, and clinical presentation. *Blood* 2002;99:2185-2191.
10. Bochtler T, Hegenbart U, Cremer FW et al. Evaluation of the cytogenetic aberration pattern in amyloid light chain amyloidosis as compared with monoclonal gammopathy of undetermined significance reveals common pathways of karyotypic instability. *Blood* 2008;111:4700-4705.
11. Chiecchio L, Dagrada GP, Ibrahim AH et al. Timing of acquisition of deletion 13 in plasma cell dyscrasias is dependent on genetic context. *Haematologica* 2009;94:1708-1713.
12. Fonseca R, Bailey RJ, Ahmann GJ et al. Genomic abnormalities in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 2002;100:1417-1424.
13. Kaufmann H, Ackermann J, Baldia C et al. Both IGH translocations and chromosome 13q deletions are early events in monoclonal gammopathy of undetermined significance and do not evolve during transition to multiple myeloma. *Leukemia* 2004;18:1879-1882.
14. Lopez-Corral L, Gutierrez NC, Vidriales MB et al. The Progression from MGUS to Smoldering Myeloma and Eventually to Multiple Myeloma Involves a Clonal Expansion of Genetically Abnormal Plasma Cells. *Clin.Cancer Res.* 2011;17:1692-1700.
15. Lopez-Corral L, Sarasquete ME, Bea S et al. SNP-based mapping arrays reveal high genomic complexity in monoclonal gammopathies, from MGUS to myeloma status. *Leukemia* 2012
16. Chng WJ, Huang GF, Chung TH et al. Clinical and biological implications of MYC activation: a common difference between MGUS and newly diagnosed multiple myeloma. *Leukemia* 2011;25:1026-1035.

17. Zhan F, Hardin J, Kordsmeier B et al. Global gene expression profiling of multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, and normal bone marrow plasma cells. *Blood* 2002;99:1745-1757.
18. Zhan F, Barlogie B, Arzoumanian V et al. Gene-expression signature of benign monoclonal gammopathy evident in multiple myeloma is linked to good prognosis. *Blood* 2007;109:1692-1700.
19. International Myeloma Working Group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br.J Haematol.* 2003;121:749-757.
20. Kyle RA, Remstein ED, Therneau TM et al. Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *N Engl J Med* 2007;356:2582-2590.
21. Perez-Persona E, Vidriales MB, Mateo G et al. New criteria to identify risk of progression in monoclonal gammopathy of uncertain significance and smoldering multiple myeloma based on multiparameter flow cytometry analysis of bone marrow plasma cells. *Blood* 2007;110:2586-2592.
22. Gutierrez NC, Sarasquete ME, Misiewicz-Krzeminska I et al. Deregulation of microRNA expression in the different genetic subtypes of multiple myeloma and correlation with gene expression profiling. *Leukemia* 2010;24:629-637.
23. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2001;98:5116-5121.



## Capítulo 4:

### **Genomic analysis of High Risk Smoldering MM.**

Lucía López-Corral, María Victoria Mateos, Luis A. Corchete, María Eugenia Sarasquete, Javier de la Rubia, Felipe de Arriba, Juan-José Lahuerta, Ramón García-Sanz, Jesús F. San Miguel, Norma C. Gutiérrez.

*Haematologica 2012. Feb 13. (Epub ahead of print).*



## **Estudio biológico del Mieloma Múltiple Quiescente de Alto Riesgo mediante análisis del perfil de expresión génica.**

**Fundamento:** El MM quiescente (MMQ) constituye una entidad clínicamente heterogénea dentro de la cual existe un grupo de alto riesgo de progresión a MM sintomático (MMQ-AR). Nuestro grupo está liderando un ensayo clínico para determinar si el tratamiento con lenalidomida más dexametasona (LenDex) en el MMQ-AR prolonga el tiempo hasta la progresión. Con el fin de conocer las características biológicas de este grupo único de pacientes se investigó si el perfil de expresión génica (GEP) era capaz de predecir la progresión a MM sintomático y la respuesta al tratamiento con LenDex, así como si dicho perfil se modificaba en el momento de la progresión.

**Métodos:** 120 MMQ-AR fueron randomizados a recibir 9 ciclos de LenDex más mantenimiento *versus* abstención. En todos los casos se separaron y congelaron las células plasmáticas (CP). Se estudió el GEP mediante el array Human Gene 1.0 ST de Affymetrix en 39 muestras pertenecientes a 33 pacientes al diagnóstico (18 de abstención y 15 de tratamiento) y 6 a la progresión.

**Resultados:** De los 18 pacientes en abstención se constató progresión en 13. Al comparar el GEP al diagnóstico de estos pacientes con el de los 5 que permanecieron asintomáticos se observó un aumento de expresión de los genes *RADD17*, *SNORD25*, *SNORD27*, *SNORD30* y *SNORD31* en los que progresaron. Posteriormente se validaron estos resultados en una serie más amplia, objetivando que la sobreexpresión al diagnóstico de los cuatro citados genes *SNORD* se correlacionaba con menor tiempo hasta la progresión ( $P < 0.03$ ). El análisis pareado de 12 muestras de CP correspondientes a 6 sujetos en abstención antes y después de la progresión, no mostró desregulación génica estadísticamente significativa. En cuanto a la rama de tratamiento, el GEP de los 15 pacientes al diagnóstico que recibieron LenDex, fue semejante independientemente de la respuesta alcanzada.

**Conclusiones:** No se encontró un GEP característico de los pacientes con MMQ-AR capaz de predecir la respuesta al tratamiento con LenDex. Sin embargo, la sobreexpresión al diagnóstico de cuatro proteínas *SNORD* se correlacionó con menor

tiempo hasta el desarrollo de síntomas CRAB. Además, la CP del MMQ-AR experimentó con frecuencia evolución clonal en el momento de la progresión a MM sintomático. Sorprendentemente, el GEP de las CP en el momento de la progresión fue similar al que presentaban al diagnóstico.

## ABSTRACT

Smoldering myeloma is an asymptomatic plasma cell dyscrasia with a heterogeneous propensity to progress to active myeloma. In order to investigate the biology of smoldering myeloma patients with high-risk of progression, we analyzed the genomic characteristics by FISH, SNP-arrays and gene expression profile of a group of patients with high-risk smoldering myeloma included in a multicenter randomized trial. Chromosomal abnormalities detected by FISH and SNP-arrays at diagnosis, were not associated to risk of progression to symptomatic myeloma. However, the overexpression of four *SNORD* genes (*SNORD25*, *SNORD27*, *SNORD30* and *SNORD31*) was correlated with shorter time to progression ( $P < 0.03$ ). When plasma cells from high-risk smoldering patients who progressed to symptomatic myeloma were sequentially analyzed, newly acquired lesions together with an increase in the proportion of plasma cells carrying a given abnormality, were observed. These findings suggest that gene expression profiling is a valuable technique to identify smoldering myeloma patients with high-risk to progression. Clinical Trials NCT00443235.

## **INTRODUCTION**

Smoldering multiple myeloma (SMM) is an asymptomatic plasma cell dyscrasia with a high propensity to progress to symptomatic myeloma (MM).<sup>1;2</sup> It meets all the diagnostic criteria for MM, but without lytic bone disease, anemia, renal failure, or hypercalcemia (CRAB symptoms).<sup>3</sup> Due to the risk of progression to symptomatic MM (approximately 10% per year), SMM patients need strict and frequent follow-up.<sup>2</sup> Globally, the median time to progression (TTP) is around four years, although this figure is highly variable as some patients have MGUS-like clinical behavior and others progress to active MM in a short time, which could be considered as early MM. Therefore, the identification of reliable biological markers to predict which SMM patients will progress, and which not, is of genuine importance.<sup>4-9</sup> In this context, the Mayo Clinic model underscores clonal plasma cell (PC) burden in bone marrow (BM) (> 10%) with high monoclonal component (MC) values (> 3 g/dl) and skewed free light-chain ratios as a high-risk factors with a median TTP of less than two years.<sup>2;10</sup> Our group has added the role of the multiparametric flow cytometry techniques for identifying aberrant PC populations (> 95% of total PC) together with the immunoparesis.<sup>11</sup>

Currently, SMM patients do not receive any treatment until progression to symptomatic MM. This “watch and wait” approach is based on clinical trials in which early treatment intervention was not associated with survival benefit.<sup>12-14</sup> However, it should be pointed out that patients included in those trials were not stratified with respect to their risk of progression to symptomatic MM. Due to the heterogeneous course of SMM patients, it does not seem appropriate to adopt a homogeneous approach, because it is possible that, while low-risk patients would not benefit from early treatment, those at high risk might benefit from early antimyeloma therapy. In line with this hypothesis, our group is conducting a multicenter randomized clinical trial designed to assess the TTP to symptomatic MM, and the efficacy and toxicity of a Lenalidomide-Dexamethasone (Len-Dex) schedule vs no treatment (abstention arm) in patients with high-risk SMM (HR-SMM).<sup>15;16</sup>

This trial has given us the opportunity to investigate the genomic characteristics of a group of patients with HR-SMM accurately defined on the basis of inclusion

criteria described in the trial. Accordingly, FISH studies, genome-wide profile using SNP-mapping arrays and gene expression analysis were used to ascertain whether the genomic abnormalities allow us to better define SMM patients with different clinical outcomes.

## **DESIGN AND METHODS**

### **Patients:**

A total of 123 HR-SMM patients were randomized to receive nine Len-Dex cycles plus maintenance (intervention arm) vs no treatment (abstention arm).<sup>15;16</sup> HR-SMM were defined by the presence of more than 10% PCs in BM and a MC of IgG >3 g/dL, IgA >2 g/dL, or Bence Jones proteinuria > 1 g/24h together with the absence of CRAB.<sup>2</sup> Patients meeting either, but not both, of these two criteria were also included in the study if they met the additional criterion of having  $\geq$  95% phenotypically aberrant PC from the total BMPC compartment (aPC/BMPC) plus immunoparesis.<sup>11</sup> The study was approved by the research ethics committees of all participating centers and written informed consent was obtained from all patients in accordance with the Helsinki Declaration.

### **Sample preparation:**

BM samples were collected at the time of inclusion, at symptomatic progression and after nine months of either treatment or abstention. In all the BM samples, CD138-positive PC selection (purity > 95%) was carried out using the AutoMACs separation system (Miltenyi-Biotec, Auburn, CA, USA). PCs were frozen in RLT buffer (Qiagen, Valencia, CA, USA) and nucleic acids were then extracted using commercially available kits (Allprepkit, Qiagen, Valencia, CA) according to the manufacturer's instructions. RNA and DNA quality and quantity were determined using 2100 Bioanalyzer (Agilent, Palo Alto, CA) and ND-1000 Spectrophotometer (Nano-Drop Technologies, Wilmington, DE), respectively.

**Interphase fluorescence *in situ* hybridization analysis:**

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analysis was performed in all samples at diagnosis and in 11 samples at symptomatic progression. The systematic screening for genomic aberrations in our institution includes FISH studies for detecting *IGH* rearrangements -t(11;14)(q13;q32), t(4;14)(p16;q32) and t(14;16)(q32;q23)- with the corresponding dual-color, dual-fusion translocation probes (Abbott Molecular/Vysis), 13q (LSI 13, RB1 13q14) and 17p deletions (LSI p53, 17p13.1) (Abbott Molecular/Vysis), and 1q gains (on 1q21/SRD 1p36, Kreatech Diagnostics, Amsterdam).<sup>17</sup> FISH results of 80% of the patients included in the present study have been previously reported.<sup>18</sup>

**Gene expression profiling and SNP-array studies:**

The gene expression profiling (GEP) was investigated using Human Gene 1.0 ST (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) in 33 samples at the time of inclusion and six at the time of progression. Differentially expressed genes were identified using Significant Analysis of Microarrays (SAM). Genome-wide detection of copy number abnormalities and loss of heterozygosity (LOH) was also performed in 20 samples at diagnosis using the Genome-Wide Human SNP Array 6.0 assay protocol (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). The complete dataset was analyzed by visual inspection using the Genotyping Console 4.0 (Affymetrix) and Chromosome Analysis Suite (ChAS) software (Affymetrix).

**Statistical analysis:**

SPSS version 15.0 (SPSS Inc.) was used for statistical analysis. The  $\chi^2$  and Fisher's exact tests were used to examine the association between genetic abnormalities and other categorical variables. TTP distribution curves were plotted using the Kaplan-Meier method: the log-rank test was used to estimate the statistical significance of differences between the curves. *P* values < 0.05 were considered to be statistically significant.

## RESULTS AND DISCUSSION

MM is often the final step in the transformation of two premalignant conditions, MGUS and SMM, which have a very variable progression rate<sup>19;20</sup>. Given the current treatment paradigm which consists of delaying treatment until CRAB symptoms start, MM is typically incurable using the available drugs. Therefore, an early therapeutic intervention, particularly in the SMM condition, could prevent or delay progression to MM, changing its adverse outcome. However, the lack of reliable clinical and biological criteria to predict the patients who will progress to MM hinder the development of individualized treatment for this group of patients. Even though the patients analyzed in the present study are SMM with a high risk of progression to MM, the time to progression remained rather variable.<sup>15;16</sup> In an attempt to identify additional biological parameters useful to characterize the natural history of SMM progression, we explored genomic abnormalities by using FISH and SNP-arrays, together with GEP.

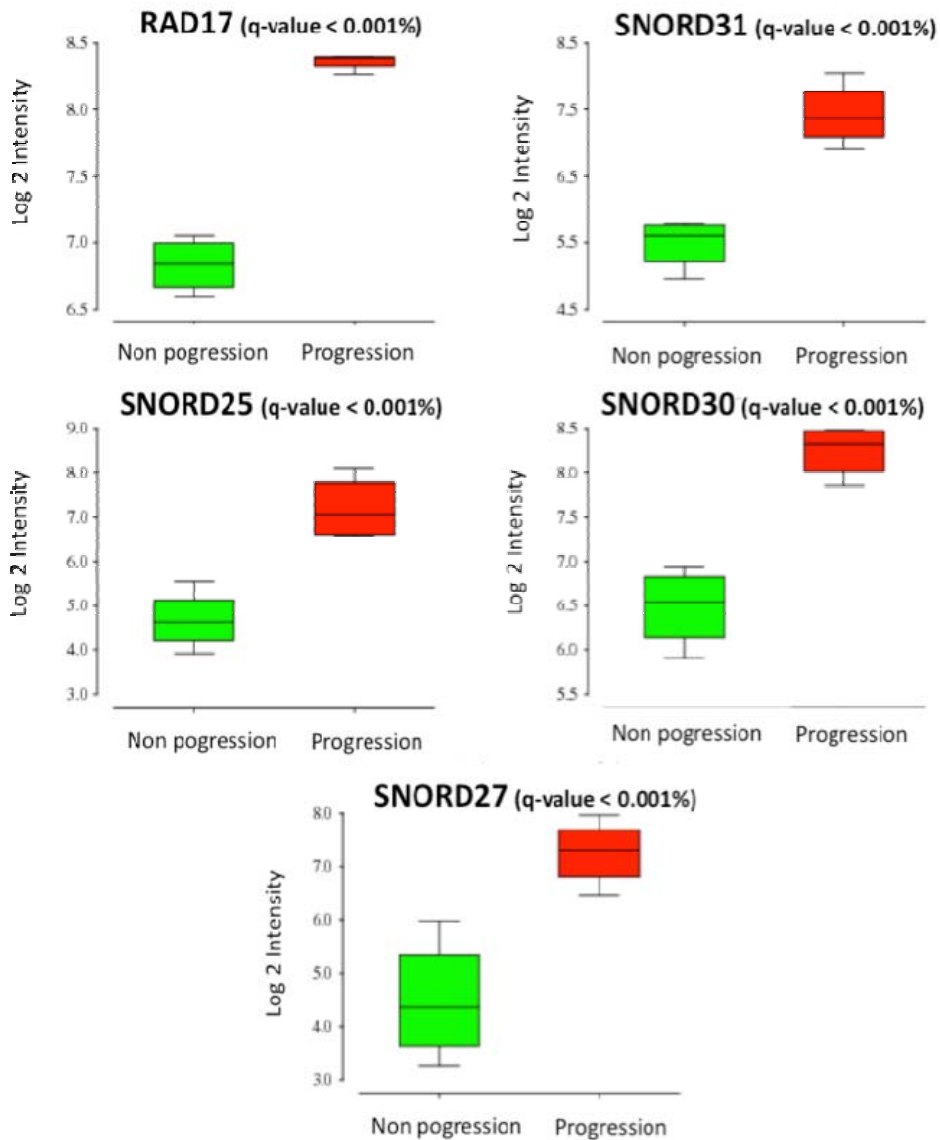
Chromosomal abnormalities assessed by FISH were identified in 91 (72%) of the 123 SMM patients. *IGH* translocations (tx) were observed in 52/123 (42%), 1q gains in 47/114 (41%), 13q deletions in 51/122 (42%), whereas 17p deletions were present in 9/123 (7%). The distribution of *IGH* tx according to 14q32 partners were: t(4;14) in 15/123 (12%), t(11;14) in 21/123 (17%), t(14;16) in 7/122 (6%) and *IGH* rearrangements with another unknown partner in 10/123 (8%). After a median follow-up of 24 months, 23/61 (38%) patients progressed to symptomatic MM in the abstention arm. When we analyzed the frequency of each of the chromosomal abnormalities in the group of patients who progressed to active MM, we did not find any statistically significant differences with regard to the SMM patients who did not progress. Even when genetic abnormalities were grouped as high or standard risk, no statistical differences were observed. Using the Kaplan-Meier method revealed no differences in the TTP in the aforementioned comparisons. For the patients allocated to the treatment arm, we tested whether chromosomal abnormalities detected by

FISH were capable of discriminating Len-Dex response. To do this, we categorized patients in two ways: (1) responders (stringent complete remission, sCR; complete remission, CR; very good partial response, VGPR; and partial response, PR) vs non-responders (stable disease, SD and progression disease, PD), and (2) CR responders (sCR and CR) vs non-CR responders (VGPR, PR, SD and PD). There were no significant differences in either comparison. However, it should be pointed out that the percentage of t(4;14) was higher in non-responders and non-CR responders than in responders and CR responders, respectively (17% vs 7% and 25% vs 12%), although the differences were not statistically significant. Thus, we could not identify a high-risk group using FISH. Nevertheless, as the FISH analysis only examined a small number of chromosomal abnormalities, the next step was to perform a high-resolution analysis of genomic imbalances by high-density 6.0 SNP-array, which scans the genome at 680-bp intervals on average. Thus, 20 patients at diagnosis were analyzed by SNP-arrays. The number and type of copy number abnormalities (CNA), the presence of homozygous deletions (HZD) and copy number-neutral LOH (CNN-LOH) were explored. Chromosomal imbalances were identified in 17 (85%) of the 20 patients analyzed. Overall, 166 DNA CNA were detected, with a median of 7.5 imbalances per abnormal case (range, 0-23). CNN-LOH was detected in five of the 20 patients and HZD in two of the 20 patients. The comparison between the 13 patients who progressed to symptomatic MM and the seven who remained stable showed no significant differences in these DNA abnormalities, although further studies extending the number of patients could be needed to confirm these results.

GEP was investigated in 33 patients (18 and 15 in the abstention and treatment arm, respectively). After a median follow up of 29 months, 13/18 (72%) patients from the abstention arm progressed to symptomatic MM, with a median TTP of 25 months. When we compared the GEP of these patients to those without CRAB, we found no differentially expressed genes between the two groups. However, this stratification of patients by progression status has the potential bias of including within the progression group both early (first 12 months) and late progressions (more than three years after diagnosis). Moreover, within the group that did not progress to symptomatic MM, the follow-up of patients was also heterogeneous (13 vs 41 months from inclusion in the trial). Therefore, to compare the most highly contrasted

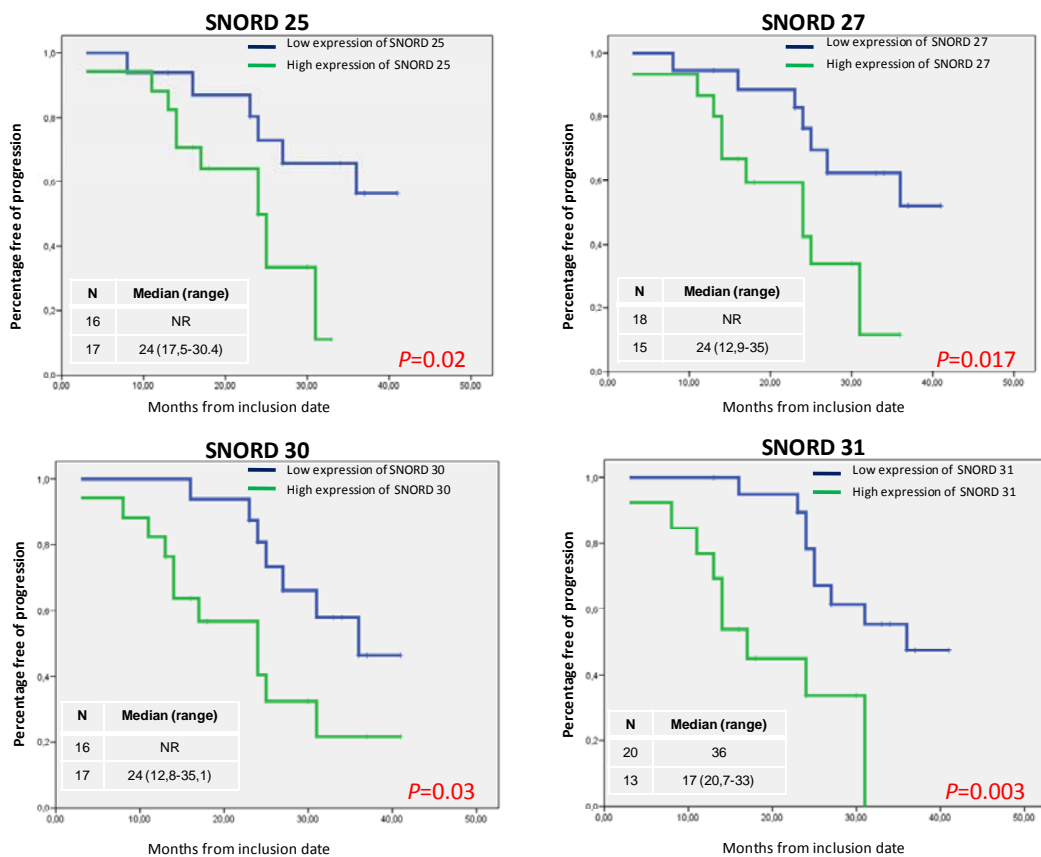


situations, we selected the four patients without progression after more than 30 months follow-up and the four patients with symptomatic progression in the first 10 months since inclusion. Overexpression of five genes (*RADD17*, *SNORD25*, *SNORD27*, *SNORD30* and *SNORD31*) in the SAM analysis was observed in the unfavorable group (Figure 1).



**Figure 1:** Expression of *RAD17*, *SNORD25*, *SNORD27*, *SNORD30* and *SNORD31* by microarrays in high-risk SMM patients who progressed to symptomatic MM and those who remained with stable disease.

We then tried to validate these results in the global group using the Kaplan-Meier method. To define high and low expression levels of these five genes, we selected a cut-off value close to the median for each of them. We found that the median TTP was significantly shorter in SMM patients with high expression levels of *SNORD25*, *SNORD27*, *SNORD30* and *SNORD31* (Figure 2).



**Figure 2: Progression-free survival in SMM patients with respect to *SNORD 25*, *SNORD 27*, *SNORD 30* and *SNORD 31* gene expression levels.**

Although overexpression of *RAD17* was associated with short TTP, the differences were not statistically significant. In conclusion, although GEP was very homogeneous independently of the clinical evolution, it should be noted that SMM

patients who developed symptomatic MM displayed high expression levels of *SNORD25*, *SNORD27*, *SNORD30*, *SNORD31* and *RAD17*. Interestingly, four of the five differentially expressed genes were small nucleolar RNA molecules (snoRNA). These non-coding RNAs (ncRNA), although less well known than other ncRNAs, such as miRNAs and siRNAs, could be actively involved in the development of cancer.<sup>21</sup> For example, *SNORA42* has been shown to act as a potential oncogene in the development and progression of lung cancer.<sup>22</sup> Moreover, homozygous and heterozygous deletions in U50, a C/D snoRNA, have been described in prostate and breast cancer tissues respectively.<sup>23,24</sup> On the other hand, there are some preliminary data showing that the genes that host snoRNAs might also contribute to cancer pathogenesis. Thus, the snoRNA host gene *GAS5* controls apoptosis and is downregulated in breast cancer.<sup>21</sup> In addition, *RAD17* is a cell cycle checkpoint gene required for cell cycle arrest and DNA damage repair. Regarding the 15 patients treated with Len-Dex, we did not find a characteristic gene signature that predicted response to therapy.

We also wanted to investigate whether myeloma cells obtained at the time of progression had genomic modifications with regard to myeloma cells from the same patient at the time of diagnosis. For this purpose, we sequentially analyzed 11 SMM patients who progressed to symptomatic MM. Newly acquired lesions detected by FISH, together with an increase in the proportion of PCs carrying a given abnormality were observed. The genetic abnormalities of these patients are described in detail in Table 1. For this analysis we have focused on patients with genetic abnormalities in <90% of the malignant PCs, since otherwise an increase in the percentages cannot be evaluated. Accordingly, three of the four patients who already carried chromosomal abnormalities in <90% of PCs had a clearly higher percentage of PCs bearing such a genetic aberration at the time of transformation into symptomatic MM. The proportion was doubled in one case, trebled in another, and increased from 68% to 92% in the third. Additionally, two SMM patients acquired a 17p deletion at the time of progression. When GEP was performed in 12 samples belonging to six control-arm patients before and after symptomatic progression, the paired SAM analysis did not detect significantly deregulated genes between the two groups.

**Table 1:** FISH evolution of 11 patients who developed symptomatic disease

Patient	Disease at diagnosis	% of PC with genetic abnormalities	Disease at progression	% of PC with genetic abnormalities	TTP (months)
1	HR-SMM	No abnormalities	MM	17p deletion (28%)	25
2	HR-SMM	1q gain (96%)	MM	Rb (27%), 1q gain (28%), 17p deletion (28%)	19
3*	HR-SMM	Rb deletion (22%); P53 deletion (24%)	MM	Rb deletion (3%); P53 deletion (86%)	14
4*	HR-SMM	1q gain (78%)	MM	1q gain (92%)	17
5	HR-SMM	Rb deletion (31%)	MM	Rb deletion (62%)	16
6	HR-SMM	Rb deletion (92%); 1q gain (90%)	MM	Rb deletion (64%), 1q gain (98%)	10
7	HR-SMM	IgH translocation (32%)	MM	IgH translocation (28%)	24
8	HR-SMM	No abnormalities	MM	No abnormalities	31
9	HR-SMM	No abnormalities	MM	No abnormalities	17
10	HR-SMM	No abnormalities	MM	No abnormalities	29
11*	HR-SMM	1q gain (92%)	MM	1q gain (98%)	17

\* These FISH results has been previously published (López-Corral et al, 2011)

In short, the present study identifies four *SNORD* genes upregulated in those SMM patients with rapid progression to symptomatic MM. Despite we failed to find chromosomal lesions associated to risk of progression, we observed an increase in the proportion of clonal PCs carrying a given abnormality, supporting the hypothesis that the number of genetically abnormal PC increases from high-risk SMM to active MM. Although this study is statistically limited by the relatively small number of patients since it is difficult to gather a large number of SMM patients with long-term follow-up, our findings are encouraging enough so as to validate them in further series and perform functional studies. In addition, the genomic analysis of those SMM with low-risk of progression to active MM could help to find a biological support to the low/high-risk SMM classification.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank “Grupo Español de Mieloma” clinicians for providing MM samples and S. González, I. Rodríguez, I. Isidro, T. Prieto y V. Gutiérrez for technical assistance.

## REFERENCES

1. Kyle RA, Rajkumar SV. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am* 2007;21(6):1093-113.
2. Kyle RA, Remstein ED, Therneau TM, Dispenzieri A, Kurtin PJ, Hodnefield JM, et al. Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *N Engl J Med* 2007;356(25):2582-90.
3. IMWG. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol* 2010;121 (5):749-757.
4. Dimopoulos MA, Moulopoulos A, Smith T, Delasalle KB, Alexanian R. Risk of disease progression in asymptomatic multiple myeloma. *Am J Med* 1993;94(1):57-61.
5. Rajkumar SV. MGUS and smoldering multiple myeloma: update on pathogenesis, natural history, and management. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2005;340-5.
6. Cesana C, Klersy C, Barbarano L, Nosari AM, Crugnola M, Pungolino E, et al. Prognostic factors for malignant transformation in monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2002;20(6):1625-34.
7. Dimopoulos MA, Moulopoulos LA, Maniatis A, Alexanian R. Solitary plasmacytoma of bone and asymptomatic multiple myeloma. *Blood* 2000;96(6):2037-44.
8. Rosiñol L, Blade J, Esteve J, Aymerich M, Rozman M, Montoto S, et al. Smoldering multiple myeloma: natural history and recognition of an evolving type. *Br J Haematol* 2003;123(4):631-6.
9. Rosiñol L, Carrio A, Blade J, Queralt R, Aymerich M, Cibeira MT, et al. Comparative genomic hybridisation identifies two variants of smoldering multiple myeloma. *Br J Haematol* 2005;130(5):729-32.
10. Dispenzieri A, Kyle RA, Katzmann JA, Therneau TM, Larson D, Benson J, et al. Immunoglobulin free light chain ratio is an independent risk factor for progression of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *Blood* 2008;111(2):785-9.
11. Perez-Persona E, Vidriales MB, Mateo G, Garcia-Sanz R, Mateos MV, de Coca AG, et al. New criteria to identify risk of progression in monoclonal gammopathy of uncertain significance and smoldering multiple myeloma based on multiparameter flow cytometry analysis of bone marrow plasma cells. *Blood* 2007;110(7):2586-92.
12. Hjorth M, Hellquist L, Holmberg E, Magnusson B, Rodjer S, Westin J, et al. Initial versus deferred melphalan-prednisone therapy for asymptomatic multiple myeloma stage I--a randomized study. Myeloma Group of Western Sweden. *Eur J Haematol* 1993;50(2):95-102.
13. Rajkumar SV, Dispenzieri A, Fonseca R, Lacy MQ, Geyer S, Lust JA, et al. Thalidomide for previously untreated indolent or smoldering multiple myeloma. *Leukemia* 2001;15(8):1274-6.
14. Rajkumar SV, Gertz MA, Lacy MQ, Dispenzieri A, Fonseca R, Geyer SM, et al. Thalidomide as initial therapy for early-stage myeloma. *Leukemia* 2003;17(4):775-9.

15. Mateos MV, Lopez-Corral L, Hernandez MT, de la Rubia J, Lahuerta JJ, Giraldo P, et al. Multicenter, Randomized, Open-Label, Phase III Trial of Lenalidomide-Dexamethasone (Len/dex) Vs Therapeutic Abstinence in Smoldering Multiple Myeloma at High Risk of Progression to Symptomatic MM: Results of the First Interim Analysis. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2009;114(22):614.
16. Mateos MV, Lopez-Corral L, Hernandez M, Giraldo P, de la Rubia J, de Arriba F, et al. Smoldering Multiple Myeloma (SMM) at High-Risk of Progression to Symptomatic Disease: A Phase III, Randomized, Multicenter Trial Based On Lenalidomide-Dexamethasone (Len-Dex) as Induction Therapy Followed by Maintenance Therapy with Len Alone Vs No Treatment. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2010;116(21):1935.
17. Gutierrez NC, Castellanos MV, Martin ML, Mateos MV, Hernandez JM, Fernandez M, et al. Prognostic and biological implications of genetic abnormalities in multiple myeloma undergoing autologous stem cell transplantation: t(4;14) is the most relevant adverse prognostic factor, whereas RB deletion as a unique abnormality is not associated with adverse prognosis. *Leukemia* 2006;21(1):143-50.
18. Lopez-Corral L, Gutierrez NC, Vidriales MB, Mateos MV, Rasillo A, Garcia-Sanz R, et al. The Progression from MGUS to Smoldering Myeloma and Eventually to Multiple Myeloma Involves a Clonal Expansion of Genetically Abnormal Plasma Cells. *Cancer Res* 2011;17(7):1692-700.
19. Kyle RA, Durie BG, Rajkumar SV, Landgren O, Blade J, Merlini G, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management. *Leukemia* 2010;24(6):1121-7.
20. Weiss BM, Abadie J, Verma P, Howard RS, Kuehl WM. A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients. *Blood* 2009;113(22):5418-22.
21. Williams GT, Farzaneh F. Are snoRNAs and snoRNA host genes new players in cancer?. *Nat Rev Cancer* 2012;12(2):84-8.
22. Mei YP, Liao JP, Shen JP et al. Small nucleolar RNA 42 acts as an oncogene in lung tumorigenesis. *Oncogene* 2011. Epub ahead of print.
23. Dong XY, Guo P, Boyd J, Sun X, Li Q, Zhou W, et al. Implication of snoRNA U50 in human breast cancer. *J Genet Genomics* 2009;36(8):447-54.
24. Dong XY, Rodriguez C, Guo P, Sun X, Talbot JC, Zhou W, et al. SnoRNA U50 is a candidate tumor-suppressor gene at 6q14.3 with a mutation associated with clinically significant prostate cancer. *Hum Mol Genet* 2008;17(7):1031-42.



## Capítulo 5:

**Gene expression profile of normal hematopoietic bone marrow cells from patients with Smoldering Myeloma is not substantially modified by sustained Lenalidomide/Dexamethasone treatment.**

Lucía López-Corral, María Victoria Mateos, Luis A. Corchete, Luis Palomera, Joan Bargay, Felipe Prósper, José García Laraña, Eduardo Olavarría, Jesús F. San Miguel, Norma C. Gutiérrez.



**Submitted for publication**

**El análisis de perfil de expresión génica de las células hematopoyéticas no tumorales de la médula ósea de los pacientes con Mieloma Múltiple Quiescente de alto riesgo no se ve modificado por el tratamiento con Lenalidomida/Dexametasona.**

**Fundamento:** El MM quiescente (MMQ) constituye una entidad clínicamente heterogénea dentro de la cual existe un grupo de alto riesgo de progresión a MM sintomático (MMQ-AR). Nuestro grupo está liderando un ensayo clínico (QuiReDex) para determinar si el tratamiento con lenalidomida más dexametasona (LenDex) en el MMQ-AR prolonga el tiempo hasta la progresión. A pesar de que son varios los mecanismos de acción a los que se les atribuye la eficacia de dicho régimen de tratamiento, aún muchos aspectos permanecen sin aclarar. Además, sólo dos estudios *in vitro* han tratado de esclarecer las vías mediante las que este tratamiento produce su principal limitación: la toxicidad hematológica. Con el fin de evaluar el impacto a nivel génico de LenDex sobre el microambiente medular y así poder aportar nuevas luces al mecanismo de acción y toxicidad de este régimen terapéutico, se ha realizado un estudio de expresión génica en la fracción hematopoyética medular no tumoral de la médula ósea antes y después de este tratamiento.

**Métodos:** Se estudió el GEP mediante el array Human Gene 1.0 ST de Affymetrix en 28 muestras correspondientes al microambiente medular de 14 pacientes con MMQ-AR incluidos en el ensayo clínico QuiReDex antes y después de nueve ciclos de tratamiento con LenDex.

**Resultados:** Sorprendentemente el estudio pareado no objetivo desregulación génica de las muestras antes y después de ser sometidas al tratamiento, siendo los GEP sumamente homogéneos.

**Conclusiones:** El microambiente medular no es sustancialmente modificado a nivel de la expresión génica tras el tratamiento prolongado con LenDex.

**ABSTRACT**

Therapy with lenalidomide plus dexamethasone (Len/Dex) has become a standard of care in multiple myeloma (MM). Changes in gene expression profile (GEP) induced by Len/Dex on the residual normal hematopoietic bone marrow (BM) cells of MM patients have not yet been explored. We analyzed the GEP of the non-tumoral BM cells from 14 smoldering MM patients before and after nine months of Len/Dex. No differentially expressed genes between samples before and after treatment using paired supervised approaches were found. These results suggest that a long exposure to Len/Dex does not induce noticeable and persistent damage on BM cells.

## INTRODUCTION

Lenalidomide is a second generation immunomodulatory drug (IMiD) with significant activity in several hematological malignancies. Although the precise molecular mechanisms through which lenalidomide exerts its effects are unknown, this drug has a pleiotropic mechanism of action including a direct antitumor effect as well as immunomodulatory activities and interference with tumor microenvironment interactions. Interestingly, these effects may also differ depending on the underlying malignancy and their tumor microenvironment (Davies & Baz, 2010).

Focusing on MM, lenalidomide is usually used in combination with dexamethasone (Len/Dex). This regime has become a standard of care in MM. The effect of this drug combination on myeloma cells has been previously analyzed (Carter *et al*, 2011; Gandhi *et al*, 2010; Hsu *et al*, 2011; Raja *et al*, 2012). Thus, dexamethasone enhances the tumoricidal effects of lenalidomide because synergistically inhibits myeloma cell growth, activates caspases and induces apoptosis (Carter *et al*, 2011; Gandhi *et al*, 2010; Hsu *et al*, 2011; Raja *et al*, 2012). However, the immune-enhancing effect of lenalidomide appears to be antagonized by combination with dexamethasone by inhibiting the T and NK-cell costimulatory effects of this IMiD (Carter *et al*, 2011; Gandhi *et al*, 2010; Hsu *et al*, 2011). In spite of the low toxicity profile of this drug combination, cytopenias, mainly neutropenia, are the most relevant side effects. The mechanism of cytopenias induced by Len/Dex remains unknown, although a maturation arrest of myeloid precursors has been involved (Liu *et al*, 2011; Pal *et al*, 2010).

Pharmacogenomic studies based on gene expression profiling (GEP) performed in myeloma cells exposed to different therapeutic agents both *in vitro* and *in vivo*, have been of great importance to unveil the mechanism of action of drugs used in cancer (Cheok *et al*, 2003; Holleman *et al*, 2004). In this setting, GEP of purified plasma cells (PC) following a short exposure to thalidomide, lenalidomide or dexamethasone has identified drug-induced changes that correlate with outcome of the patients (Burington *et al*, 2008). However, the potential changes at gene expression level induced by lenalidomide on the residual normal hematopoietic BM cells (excluding PC) of MM patients, have not yet been explored.

We hypothesized that because of the wide range of potential activities attributed to lenalidomide, the exposure of BM to lenalidomide for a long time could induce relevant changes in the gene expression pattern of non tumoral BM cells. This expression modification might affect genes involved in tumoral/stromal cell interactions and also genes participating in mechanism of toxicity. To answer this hypothesis we analyzed the GEP of the non-tumoral BM cells from a group of high-risk SMM (HR-SMM) patients before and after nine months of treatment with Len/Dex.

## MATERIAL AND METHODS

### ***Patients and samples:***

Fourteen HR-SMM patients included in the intervention arm of QuiReDex clinical trial were selected for this study (Mateos *et al*, 2011). These patients received nine monthly cycles of lenalidomide (25 mg/day x 21 days) and dexamethasone (total dose: 320 mg) as induction therapy. HR-SMM were defined by the presence of more than 10% PC in BM and a monoclonal component of IgG>3 g/dL, IgA>2 g/dL, or Bence Jones proteinuria>1 g/24h together with the absence of CRAB (Kyle *et al*, 2007). Patients meeting either, but not both, of these two criteria were also considered HR-SMM if they met the additional criterion of having ≥95% phenotypically aberrant PC from the total BMPC compartment (aPC/BMPC) plus immunoparesis (Perez-Persona *et al*, 2007). The study was approved by the research ethics committees of all participating centers and written informed consent was obtained from all patients in accordance with the Helsinki Declaration.

Twenty-eight bone marrow samples from 14 patients with HR-SMM were extracted: 14 samples were obtained before Len/Dex treatment was started, and 14 after 9 months of Len/Dex treatment. In all cases the tumor cells were discarded by CD138 positive selection, in order to have a purified population of residual hematopoietic normal BM cells not contaminated by PC.

Total RNA was extracted using Trizol reagent (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) and purified with RNeasy Mini Kit (Quiagen, Valencia, CA, USA). RNA quality and quantity was determined using a 2100 Bio-analyser (Agilent, Palo Alto, CA, USA).

### ***Gene expression profiling studies:***

RNA labeling and microarray hybridization to Human Gene 1.0 ST Array (Affymetrix) have been previously reported (Gutierrez *et al*, 2010).

In order to classify the samples, multidimensional scaling method (MDS) implemented with SIMFIT statistical package (version 6.4.1, available at <http://www.simfit.manchester.ac.uk>) was performed using Euclidean distance.

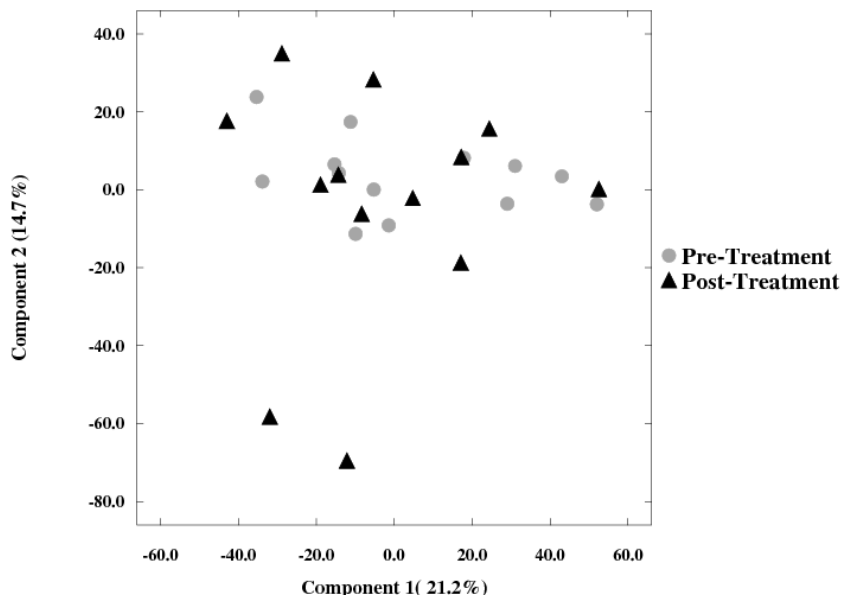
A paired statistical analysis was performed and differentially expressed genes were identified using 3 different approaches: Significant Analysis of Microarrays (SAM)

(<http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM>) (significant genes were defined based on the lowest false discovery ratio and controlling the q-value for the gene list), D-chip (comparison criteria used were lower bound -fold change ( $E/B > 1.2$ ) or ( $B/E > 1.2$ ), mean difference ( $E - B > 100$ ) or ( $B - E > 100$ )-,  $t$  test  $P < 0.05$ , where  $B$  is the mean expression of the pretreatment group and  $E$  is the mean expression of the post-treatment group), and paired  $t$ -test (limma) from POMELO suite (<http://pomelo2.bioinfo.cnio.es>).

## RESULTS AND DISCUSSION

Most pharmacogenomic studies have focused on the changes induced on tumor cells by a particular drug. However, it is now well known that the microenvironment plays a relevant role in tumor pathogenesis. Therefore, the investigation of changes induced by antitumor agents on the residual BM hematopoietic compartment could be of major interest.

Initially, we investigated whether the samples obtained from 14 HR-SMM patients before Len/Dex treatment and those from the same patients obtained after treatment were separated into clusters based on similarities in gene expression. The MDS analysis performed on a 17,491 probe set passing the variation filter showed intermingled samples and clusters cannot be defined (Fig 1). In a second step, we looked for differentially expressed genes between samples before and after treatment using paired supervised approaches. No significant deregulated genes between the pre and post treatment samples were detected when we used SAM algorithm. Subsequently other less restrictive paired analysis were performed in order to rescue subtle differences between the two periods. However, D-chip and paired *t*-test also failed to recognize deregulated genes between both situations.



**Figure 1:** Multidimensional scaling was applied to the 20903 genes that passed the variation filter. Samples are plotted in two-dimensional space using the following figures: pre-treatment samples: gray circles; post-treatment samples: black triangles. It can be observed that pre-treatment and post-treatment samples are not cluster.

One explanation for these unexpected results could be that we analyzed the total BM and gene expression changes affecting specific cell subpopulations could be diluted by the rest of BM cells. However, the use of the whole cellularity contained in the BM or lymph nodes has been advocated as an optimal strategy to investigate the potential contribution of BM microenvironment to disease pathogenesis or to drug resistance (Burington *et al*, 2008; Dave *et al*, 2004).

Other potential explanation could be that the main effect of Len/Dex on hematopoiesis was restricted to immature precursors, which account for a very low percentage of BM cells, precluding the identification of changes in their gene expression. In fact, the only two studies, which have investigated the underlying mechanism of IMiD-induced cytopenias, have reported that the mechanism of neutropenia and thrombocytopenia may be related to the inhibition of the maturation of granulocyte precursors and megakaryocytes, by down-regulation of the transcription factor PU.1 and by suppressing the expression of GATA1, respectively. In this setting, it has been shown that IMiDs down-regulate PU.1, a key transcription factor involved in granulocyte differentiation both *in vitro* and in patients treated with lenalidomide. Loss of PU.1 results in transient maturation arrest with medullary accumulation of immature myeloid precursors and subsequent neutropenia (Pal *et al*, 2010). In addition, the effects of IMiDs on megakaryopoiesis has been recently investigated showing that IMiDs maintain and expand early hematopoietic progenitors, but the loss of key transcription factors such as GATA1 and CCND1, both critical for megakaryopoiesis, precludes from continued (Liu *et al*, 2011). Similarly to neutropenia, this might lead to maturational arrest of megakaryocytes with accumulation of immature megakaryocytic precursors and subsequent thrombocytopenia (Liu *et al*, 2011).

The present study cannot rule out gene expression changes for a temporal period on residual BM cells after a Len/Dex treatment, which could be negligible after longer exposures. However, our results would indicate that the potential effects of a long exposure to Len/Dex does not entail noticeable and persistent damage to BM cells.



## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank “Grupo Español de Mieloma” clinicians for providing MM samples and S. González, I. Rodriguez, I. Isidro, T. Prieto y V. Gutiérrez for technical assistance.

## REFERENCES

- Burington B, Barlogie B, Zhan F, Crowley J & Shaughnessy JD, Jr. (2008) Tumor cell gene expression changes following short-term in vivo exposure to single agent chemotherapeutics are related to survival in multiple myeloma. *Clinical Cancer Research*, **14**, 4821-4829.
- Carter CR, Feyler S, Smalle N, Scott GB, Parrish C, Cullen K, Kallmeyer C, Wood PM & Cook G (2011) Effect of combined dexamethasone/lenalidomide therapy on NK cell-receptor levels in myeloma patients. *Blood*, **118**, 6465-6466.
- Cheok MH, Yang W, Pui CH, Downing JR, Cheng C, Naeve CW, Relling MV & Evans WE (2003) Treatment-specific changes in gene expression discriminate in vivo drug response in human leukemia cells. *Nature Genetics*, **34**, 85-90.
- Dave SS, Wright G, Tan B, Rosenwald A, Gascoyne RD, Chan WC, Fisher RI, Braziel RM, Rimsza LM, Grogan TM, Miller TP, LeBlanc M, Greiner TC, Weisenburger DD, Lynch JC, Vose J, Armitage JO, Smeland EB, Kvaloy S, Holte H, Delabie J, Connors JM, Lansdorp PM, Ouyang Q, Lister TA, Davies AJ, Norton AJ, Muller-Hermelink HK, Ott G, Campo E, Montserrat E, Wilson WH, Jaffe ES, Simon R, Yang L, Powell J, Zhao H, Goldschmidt N, Chiorazzi M & Staudt LM (2004) Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *New England Journal of Medicine*, **351**, 2159-2169.
- Davies F & Baz R (2010) Lenalidomide mode of action: linking bench and clinical findings. *Blood Reviews*, **24 Suppl 1**, S13-S19.
- Gandhi AK, Kang J, Capone L, Parton A, Wu L, Zhang LH, Mendy D, Lopez-Girona A, Tran T, Sapinoso L, Fang W, Xu S, Hampton G, Bartlett JB & Schafer P (2010) Dexamethasone synergizes with lenalidomide to inhibit multiple myeloma tumor growth, but reduces lenalidomide-induced immunomodulation of T and NK cell function. *Current Cancer Drug Targets*, **10**, 155-167.
- Gutierrez NC, Sarasquete ME, Misiewicz-Krzeminska I, Delgado M, De Las RJ, Ticona FV, Ferminan E, Martin-Jimenez P, Chillon C, Risueno A, Hernandez JM, Garcia-Sanz R, Gonzalez M & San Miguel JF (2010) Deregulation of microRNA expression in the different genetic subtypes of multiple myeloma and correlation with gene expression profiling. *Leukemia*, **24**, 629-637.

- Holleman A, Cheok MH, den Boer ML, Yang W, Veerman AJ, Kazemier KM, Pei D, Cheng C, Pui CH, Relling MV, Janka-Schaub GE, Pieters R & Evans WE (2004) Gene-expression patterns in drug-resistant acute lymphoblastic leukemia cells and response to treatment. *New England Journal of Medicine*, **351**, 533-542.
- Hsu AK, Quach H, Tai T, Prince HM, Harrison SJ, Trapani JA, Smyth MJ, Neeson P & Ritchie DS (2011) The immunostimulatory effect of lenalidomide on NK-cell function is profoundly inhibited by concurrent dexamethasone therapy. *Blood*, **117**, 1605-1613.
- Kyle RA, Remstein ED, Therneau TM, Dispenzieri A, Kurtin PJ, Hodnefield JM, Larson DR, Plevak MF, Jelinek DF, Fonseca R, Melton LJ & Rajkumar SV (2007) Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *New England Journal of Medicine*, **356**, 2582-2590.
- Liu A, Donnenberg V, Li S, Gollin SM, Ma H, Lu C, Jin M, Stolz DB, Mapara MY, Monaghan SA & Lentzsch S (2011) IMiD(R) Immunomodulatory Drugs Lenalidomide and Pomalidomide Inhibit the Maturation of Megakaryocytes by Suppressing the Expression of GATA1. *Blood*, **118**, (abstract 1840).
- Mateos MV, Lopez-Corral L, Hernandez M, Giraldo P, de la Rubia J, de Arriba F, Rosinol L, Lahuerta JJ, Palomera L, Bargay J, Oriol A, Prosper F, Lopez J, Olavarria E, Martino ML, Teruel AI, Hernandez JM, Esteves G, Mariz JMJ, Leal-da-Costa F, Alegre A, Guzman JL, Guia ALdl, Baquero J, Quintana N, Garcia JL & Miguel J (2011) Smoldering Multiple Myeloma (SMM) At High-Risk of Progression to Symptomatic Disease: A Phase III, Randomized, Multicenter Trial Based On Lenalidomide-Dexamethasone (Len-Dex) As Induction Therapy Followed by Maintenance Therapy with Len Alone Vs No Treatment. *Blood*, **118**, (abstract 991).
- Pal R, Monaghan SA, Hassett AC, Mapara MY, Schafer P, Roodman GD, Ragni MV, Moscinski L, List A & Lentzsch S (2010) Immunomodulatory derivatives induce PU.1 down-regulation, myeloid maturation arrest, and neutropenia. *Blood*, **115**, 605-614.
- Perez-Persona E, Vidriales MB, Mateo G, Garcia-Sanz R, Mateos MV, de Coca AG, Galende J, Martin-Nunez G, Alonso JM, de las Heras N, Hernandez JM, Martin A, Lopez-Berges C, Orfao A & San Miguel JF (2007) New criteria to identify risk of progression in monoclonal gammopathy of uncertain significance and smoldering multiple myeloma based on multiparameter flow cytometry analysis of bone marrow plasma cells. *Blood*, **110**, 2586-2592.
- Raja KR, Kovarova L & Hajek R (2012) Induction by lenalidomide and dexamethasone combination increases regulatory cells of patients with previously untreated multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*.

*GEP of normal BM cells from SMM is not modified by Len/Dex*

## **Discusión**



El MM constituye la segunda hemopatía más frecuente, y a pesar de los grandes avances desarrollados en los últimos años, continúa siendo hoy en día una neoplasia incurable<sup>1,2</sup>. Representa el paradigma hematológico para la investigación de la patogenia de la transformación en etapas de los tumores, puesto que se ha confirmado que prácticamente siempre el MM procede de una entidad premaligna que se transforma a una enfermedad maligna; en otras palabras, de una fase inicial/benigna llamada GMSI, evoluciona a una fase intermedia/indolente llamada MM quiescente, y finalmente a una fase avanzada/sintomática<sup>3,4</sup>. A pesar del comportamiento clínico radicalmente tan diferente de la GMSI, del MMQ y del MM, estas tres entidades comparten la misma célula neoplásica, que es una célula plasmática (CP) clonal y aberrante.

Desafortunadamente, el interrogante: *¿cuál es el mecanismo por el cual una CP clonal y aberrante pero quiescente, se transforma en una CP agresiva capaz de producir efectos devastadores en el cuerpo humano?* no está resuelto. El esclarecer las bases patogénicas de la transformación en etapas es clave, puesto que nos permitirá, por un lado, comprender por qué un clon quiescente se vuelve agresivo en algunos pacientes mientras que en otros permanece estable incluso de por vida, y por otro, desarrollar estrategias terapéuticas que nos permitan frenar dicha transformación.

La GMSI representa el primer escalón del proceso evolutivo. Se trata de una discrasia de CP benigna y asintomática, caracterizada por baja masa tumoral en la médula ósea (MO) y un componente monoclonal en suero y/o orina producido por las CP clonales -pero aún benignas-<sup>5</sup>. Constituye uno de las condiciones premalignas más frecuentes en la población general, estando presente en aproximadamente el 3% de la población general por encima de los 50 años, y en más de un 5% en aquellos mayores de 70 años<sup>6</sup>. El MMQ cumple los mismos criterios que el MM sintomático, pero, a diferencia de este y en común con la GMSI, su diagnóstico exige la ausencia de síntomas CRAB (anemia, hipercalcemia, insuficiencia renal y lesiones óseas)<sup>5</sup>. Por lo tanto, GMSI y MMQ son entidades premalignas y asintomáticas por definición, si bien difieren significativamente en el riesgo de progresión a MM sintomático, siendo de aproximadamente un 1% al año en la GMSI, y un 10% al año en el MM Smoldering<sup>7</sup>.

A pesar de que se han identificado factores de riesgo de progresión, continuamos en la actualidad sin tener claro qué hace que una CP clonal benigna se transforme a maligna, o, por el contrario, permanezca quiescente durante más de 20 años<sup>7-10</sup>. *¿Las diferencias en el comportamiento clínico reflejan características diferenciales genómicas/genotípicas específicas?*<sup>11</sup>. Estudios citogenéticos mediante hibridación *in situ* fluorescente (HISF), han demostrado que la mayoría de las lesiones genéticas típicas del MM están presentes en la GMSI, incluso aquellas con pronóstico adverso en el MM<sup>12</sup>. De forma equiparable en el MMQ, y a pesar de ser éste una entidad muy poco estudiada, también se han descrito alteraciones citogenéticas propias de la entidad sintomática<sup>13,14</sup>.

En la presente tesis doctoral se ha confirmado, no sólo mediante HISF (*capítulo 1*) sino también con técnicas genómicas de alta resolución (*capítulo 2*) y en series amplias y bien caracterizadas de pacientes, que la GMSI y el MMQ reproducen el espectro de alteraciones citogenéticas del MM sintomático, si bien la frecuencia de dichas alteraciones aumenta conforme se avanza en los estadios evolutivos, mostrando un incremento de la complejidad genética<sup>15</sup>. Ahora bien, una diferencia fundamental que hemos encontrado entre las tres entidades es el hecho de que el porcentaje de CP clonales portadoras de una determinada aberración citogenética es menor en GMSI que en MMQ y que en MM<sup>15</sup>. Todo ello nos permite afirmar que la transición de GMSI a MMQ y a MM no se asocia con una alteración citogenética característica, sino con un aumento del número de CP clonales genéticamente aberrantes, sugiriendo la selección y expansión clonal como base patogenética de la transformación.

Por otro lado, el análisis minucioso y pionero de los tres estadios de las gammapatías monoclonales mediante SNP-arrays de última generación (*capítulo 2*), nos ha permitido identificar nuevas regiones cromosómicas implicadas en deleciones homocigotas, alteraciones focales y recurrentes y regiones comúnmente alteradas – ganadas y perdidas-. El análisis en profundidad de los genes contenidos en estas áreas puede proporcionar nuevas luces en el conocimiento de la etiopatogenia, así como en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. Sumado a su alta resolución, otra de las ventajas de los SNP-arrays es el permitir el análisis de las pérdidas de

heterocigosidad (LOH), cuya relación con la carcinogénesis es bien conocida<sup>16,17</sup>. En este sentido, hemos demostrado que la presencia de pérdida de heterocigosidad sin cambio en el número de copias o disomía uniparental, es un evento génico común a los tres estadios, pero con una incidencia significativamente más elevada en las fases avanzadas de la enfermedad (*capítulo 2*).

Además, la aplicación del análisis de perfil de expresión génica mediante microarrays al estudio de la transformación en etapas del MM ha revelado que, a pesar de que la mayoría de los cambios se producen en el paso de CP sana a CP de la GMSI, hay también genes relevantes desregulados en la progresión de GMSI a MM<sup>18</sup>. Aunque hay numerosos trabajos que analizan el perfil de expresión génica del MM, son muy pocos los que comparan las entidades premalignas con el MM sintomático, basándose estos en series escasas, mal caracterizadas y heterogéneas<sup>18-21</sup>. En el presente trabajo doctoral hemos analizado el transcriptoma y profundizado en las diferencias a nivel de perfil de expresión entre las tres entidades (*capítulo 3*). Inicialmente quisimos identificar el panel de genes que caracterizan a la CP de las gammapatías monoclonales como grupo y la diferencian de la CP sana, objetivando un total de 126 genes que se agruparon en rutas génicas muy relevantes, destacando la desregulación de la ruta de *RAS*, la sobreexpresión homogénea de muchas proteínas ribosomales, y la desregulación de los receptores de corticoides, con genes tan importantes como los que codifican para la *IL-8*, *BCL-2* o *SGK1*. Posteriormente nos centramos en los genes que caracterizaban a los extremos, esto es, a las formas de gammaptía monoclonal más indolentes y las más agresivas. Los más de 1000 genes obtenidos se englobaron nuevamente en rutas biológicas de gran relevancia, como la vía de *PI3K/AKT*, de *NFκB* o de *P53*. Además, fue muy evidente el desequilibrio a favor de la inhibición de la apoptosis en el MM, junto a infraexpresión de supresores tumorales, entre otros hallazgos. Finalmente buscamos, por considerarlos claves, aquellos genes significativamente desregulados que presentaran un incremento o decremento de expresión progresivo y significativo a medida que se pasaba de GMSI a MMQ y a MM. Sorprendentemente, todos aquellos que presentaron un incremento progresivo en su expresión fueron genes *SNORD*, que constituyen RNA no codificante



pero sí relevante, puesto que han sido implicados en la carcinogénesis<sup>18-20,22-24</sup>. De la misma manera sólo 3 genes, (*MEGF9*, *VCAN* y *APAF1*), claves y bien conocidos, presentaron una disminución progresiva de su expresión.

Tras analizar las bases patogenéticas de la transformación en etapas del MM, nos hemos centrado en el estudio de una entidad que consideramos crítica en las gammapatías monoclonales: el MMQ con alto riesgo de progresión. A pesar de que el riesgo de progresión del MMQ a MM se estima globalmente en un 10% anual, se trata de una entidad clínicamente muy heterogénea<sup>7</sup>. Por ello es una prioridad encontrar marcadores biológicos fiables que nos permitan predecir qué pacientes con MMQ progresarán rápidamente a MM y cuáles no lo harán. En este sentido, tanto la Clínica Mayo como nuestro grupo han identificado factores de alto riesgo de progresión a MMQ<sup>8-10,25</sup>. Sin embargo, el estándar de tratamiento del MMQ en el momento actual continúa siendo la abstención terapéutica hasta el desarrollo de síntomas<sup>25</sup>. Esta estrategia de "watch and wait" se basa en estudios randomizados que, bien con alquilantes, bien con inmunomoduladores, no han mostrado beneficio claro del tratamiento precoz<sup>26-28</sup>. Ahora bien, en ninguno de estos ensayos se estratificó a los pacientes en base al riesgo de progresión, de forma que puede que mientras que aquellos MMQ de bajo riesgo no se beneficien del tratamiento precoz, aquellos de alto riesgo sí lo hagan. Sobre esta base asienta el ensayo clínico QUIREDEX, liderado por nuestro grupo, en el que 120 pacientes con MMQ de alto riesgo han sido randomizados a recibir tratamiento con lenalidomida y dexametasona (LenDex) *versus* el gold estándar: la abstención terapéutica. Los resultados preliminares muestran la ventaja de Len-Dex tanto en tiempo hasta la progresión como en supervivencia global<sup>29-31</sup>.

Este ensayo nos ha dado una oportunidad única para estudiar, por primera vez, la biología de la CP del MMQ de alto riesgo mediante HSF, SNP-arrays y microarrays de expresión génica (capítulo 4). Sorprendentemente, el tipo y frecuencia de alteraciones citogenéticas al diagnóstico fue superponible a las descritas en el MM sintomático, no encontrándose una firma genética capaz de predecir la progresión o la respuesta al tratamiento con LenDex, salvo una tendencia hacia la ausencia de respuesta y

resistencia en aquellos MMQ con t(4;14). Sin embargo, la sobreexpresión de cuatro genes *SNORD* se correlacionó con un menor tiempo hasta la progresión a MM sintomático. Además, tras haber evaluado biológicamente la CP del MMQ al diagnóstico, tratamos de identificar los cambios que se producen en la genómica de la CP en el momento de la progresión. No se objetivaron diferencias a nivel de expresión entre las CP de los sujetos con MMQ al diagnóstico y en el momento de la progresión. Sin embargo, dos de los 11 pacientes estudiados mediante HISF adquirieron la delección de 17p, y en otros tres casos ya aberrantes al diagnóstico, el porcentaje de CP portadoras de la alteración se incrementó de forma marcada en el momento de la progresión, lo que supone una muestra más del proceso de selección y expansión clonal que sufren las CP a lo largo de la progresión.

Tras analizar en profundidad la CP del MMQ de alto riesgo, hemos querido estudiar la celular hematopoyética no tumoral de la médula ósea, conocida como "micromedioambiente" (capítulo 5). Puesto que la mayor parte de la eficacia antimieloma de LenDex se le atribuye a su vertiente inmunomoduladora y antiangiogénica, hemos tratado de evaluar el impacto de este tratamiento sobre la expresión génica del micromedioambiente<sup>32</sup>. De esta manera buscábamos aportar nuevos conocimientos en los mecanismos de acción y toxicidad de este régimen terapéutico. Sin embargo, se objetivó que los perfiles de expresión pre y post tratamiento fueron sumamente homogéneos, no encontrando desregulación génica significativa. Aunque carecemos de una explicación clara para este inesperado hallazgo, es posible que la ausencia de cambios se deba a que se haya analizado de forma global la población hematopoyética no tumoral, y quizá exista desregulación génica de poblaciones celulares o progenitores inmaduros que, debido a la escasa cuantía de estos, quede enmascarada. Por ello, en futuros trabajos realizaremos análisis por separado de los distintos subgrupos que comportan el micromedioambiente medular.

REFERENCES

1. Palumbo A, Anderson K. Multiple myeloma. *N.Engl.J.Med.* 2011;364:1046-1060.
2. San-Miguel JF, Mateos MV. Can multiple myeloma become a curable disease? *Haematologica* 2011;96:1246-1248.
3. Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood* 2009;113:5412-5417.
4. Weiss BM, Abadie J, Verma P, Howard RS, Kuehl WM. A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients. *Blood* 2009;113:5418-5422.
5. Kyle RA, Rajkumar SV. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia* 2008;23:3-9.
6. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV et al. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N.Engl.J.Med.* 2006;354:1362-1369.
7. Kyle RA, Remstein ED, Therneau TM et al. Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *N Engl J Med* 2007;356:2582-2590.
8. Dispenzieri A, Kyle RA, Katzmann JA et al. Immunoglobulin free light chain ratio is an independent risk factor for progression of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *Blood* 2008;111:785-789.
9. Perez-Persona E, Vidriales MB, Mateo G et al. New criteria to identify risk of progression in monoclonal gammopathy of uncertain significance and smoldering multiple myeloma based on multiparameter flow cytometry analysis of bone marrow plasma cells. *Blood* 2007;110:2586-2592.
10. Rajkumar SV, Kyle RA, Therneau TM et al. Serum free light chain ratio is an independent risk factor for progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 2005;106:812-817.
11. Korde N, Kristinsson SY, Landgren O. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering multiple myeloma (SMM): novel biological insights and development of early treatment strategies. *Blood* 2011
12. Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J et al. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia* 2009;23:2210-2221.
13. Avet-Loiseau H, Facon T, Grosbois B et al. Oncogenesis of multiple myeloma: 14q32 and 13q chromosomal abnormalities are not randomly distributed, but correlate with natural history, immunological features, and clinical presentation. *Blood* 2002;99:2185-2191.
14. Chiecchio L, Dagrada GP, Ibrahim AH et al. Timing of acquisition of deletion 13 in plasma cell dyscrasias is dependent on genetic context. *Haematologica* 2009;94:1708-1713.
15. Lopez-Corral L, Gutierrez NC, Vidriales MB et al. The Progression from MGUS to Smoldering Myeloma and Eventually to Multiple Myeloma Involves a Clonal Expansion of Genetically Abnormal Plasma Cells. *Clin.Cancer Res.* 2011;17:1692-1700.
16. Lapunzina P, Monk D. The consequences of uniparental disomy and copy number neutral loss-of-heterozygosity during human development and cancer. *Biol.Cell* 2011;103:303-317.

17. de LN, Hehir-Kwa JY, Simons A et al. SNP array analysis in constitutional and cancer genome diagnostics--copy number variants, genotyping and quality control. *Cytogenet.Genome Res.* 2011;135:212-221.
18. Davies FE, Dring AM, Li C et al. Insights into the multistep transformation of MGUS to myeloma using microarray expression analysis. *Blood* 2003;102:4504-4511.
19. Anguiano A, Tuchman SA, Acharya C et al. Gene expression profiles of tumor biology provide a novel approach to prognosis and may guide the selection of therapeutic targets in multiple myeloma. *J.Clin.Oncol.* 2009;27:4197-4203.
20. Mattioli M, Agnelli L, Fabris S et al. Gene expression profiling of plasma cell dyscrasias reveals molecular patterns associated with distinct IGH translocations in multiple myeloma. *Oncogene* 2005;24:2461-2473.
21. Zhan F, Hardin J, Kordsmeier B et al. Global gene expression profiling of multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, and normal bone marrow plasma cells. *Blood* 2002;99:1745-1757.
22. Dong XY, Guo P, Boyd J et al. Implication of snoRNA U50 in human breast cancer. *J.Genet.Genomics* 2009;36:447-454.
23. Dong XY, Rodriguez C, Guo P et al. SnoRNA U50 is a candidate tumor-suppressor gene at 6q14.3 with a mutation associated with clinically significant prostate cancer. *Hum.Mol.Genet.* 2008;17:1031-1042.
24. Chang LS, Lin SY, Lieu AS, Wu TL. Differential expression of human 5S snoRNA genes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2002;299:196-200.
25. Kyle RA, Durie BG, Rajkumar SV et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management. *Leukemia* 2010;24:1121-1127.
26. Barlogie B, van RF, Shaughnessy JD, Jr. et al. Seven-year median time to progression with thalidomide for smoldering myeloma: partial response identifies subset requiring earlier salvage therapy for symptomatic disease. *Blood* 2008;112:3122-3125.
27. Grignani G, Gobbi PG, Formisano R et al. A prognostic index for multiple myeloma. *Br.J.Cancer* 1996;73:1101-1107.
28. Hjorth M, Hellquist L, Holmberg E et al. Initial versus deferred melphalan-prednisone therapy for asymptomatic multiple myeloma stage I--a randomized study. *Myeloma Group of Western Sweden. Eur.J.Haematol.* 1993;50:95-102.
29. Mateos MV, Lopez-Corral L, Hernandez MT et al. Multicenter, Randomized, Open-Label, Phase III Trial of Lenalidomide-Dexamethasone (Len/dex) Vs Therapeutic Abstinence in Smoldering Multiple Myeloma at High Risk of Progression to Symptomatic MM: Results of the First Interim Analysis. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2009;114:614.
30. Mateos MV, Lopez-Corral L, Hernandez M et al. Smoldering Multiple Myeloma (SMM) at High-Risk of Progression to Symptomatic Disease: A Phase III, Randomized, Multicenter Trial Based On Lenalidomide-Dexamethasone (Len-Dex) as Induction Therapy Followed by Maintenance Therapy with Len Alone Vs No Treatment. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2010;116:1935.
31. Mateos MV, Lopez-Corral L, Hernandez M et al. Smoldering Multiple Myeloma (SMM) At High-Risk of Progression to Symptomatic Disease: A Phase III, Randomized, Multicenter Trial Based

- On Lenalidomide-Dexamethasone (Len-Dex) As Induction Therapy Followed by Maintenance Therapy with Len Alone Vs No Treatment. ASH Annual Meeting Abstracts 2011;118:991.
32. Quach H, Ritchie D, Stewart AK et al. Mechanism of action of immunomodulatory drugs (IMiDS) in multiple myeloma. *Leukemia* 2010;24:22-32.

## **Conclusiones**



1. El estudio de las gammapatías monoclonales mediante hibridación *in situ* fluorescente corrobora que las translocaciones de *IGH*, las deleciones de 13q y 17p, y las ganancias de 1q están presentes desde los estadios iniciales de la transformación neoplásica (GMSI). Sin embargo, la progresión de GMSI a MMQ y finalmente a MM conlleva un incremento del número de células plasmáticas genéticamente anormales.

2. La utilización de técnicas de análisis genómico de alta resolución, como son los arrays de SNPs, demuestran que, a pesar de que el MM tiene más alteraciones cromosómicas y más LOH, la transición de GMSI a MM no se asocia con una alteración cromosómica determinada, sino más bien con una expansión clonal de subclones genéticamente aberrantes ya presentes en las fases iniciales.

3. El transcriptoma de la célula plasmática clonal tanto de la GMSI, como del MMQ y del MM analizado mediante microarrays de expresión muestra una desregulación significativa de las rutas de *RAS*, *VEGF*, *PI3K/AKT*, *NFkB* y *P53* cuando se compara con la CP normal.

4. En cuanto al MMQ con alto riesgo de progresión a MM sintomático:

a. No se ha encontrado una firma genética que prediga la respuesta al tratamiento con Lenalidomida más Dexametasona.

b. El perfil de alteraciones cromosómicas o de LOH no predice el riesgo de progresión del MM quiescente de alto riesgo. Sin embargo, la sobreexpresión de varios genes *SNORD* se correlaciona con menor tiempo hasta el desarrollo de sintomatología CRAB.

c. La célula plasmática del MM quiescente de alto riesgo experimenta con frecuencia evolución clonal en el momento de la progresión a MM sintomático. Por el contrario, su perfil de expresión génica no se ve modificado.

d. El tratamiento con Lenalidomida más Dexametasona en el MM quiescente de alto riesgo no modifica el perfil de expresión de la celularidad hematopoyética no tumoral de la médula ósea.





**Material derivado de los trabajos**



L Lopez-Corral, NC Gutierrez, MB Vidriales, MV Mateos, R García-Sanz, B Paiva y JF San Miguel. "The progression from MGUS to smoldering myeloma and eventually to multiple myeloma involves a clonal expansion of genetically abnormal plasma cells". ***Clin Cancer Res. 2011 Apr 1;17(7):1692-700.***

Lucía López Corral, María Eugenia Sarasquete, Sílvia Beà, Ramón García Sanz, María Victoria Mateos, Luis Antonio Corchete, Eva M. García, Joan Bladé, Albert Oriol, Miguel T. Hernández García, Pilar Giraldo, José Hernández, Marcos González, Jesús María Hernández Rivas, Jesús F. San Miguel, Norma C. Gutiérrez. "SNP-based mapping arrays reveal high genomic complexity in monoclonal gammopathies: from the MGUS to MM status". ***Leukemia. 2012 May 8. doi: 10.1038/leu.2012.128. [Epub ahead of print]***

Lucía López-Corral, Luis Antonio Corchete, María Victoria Mateos, Ramón García-Sanz, Eva M. García, Juan-José Lahuerta, Joan Bladé, Albert Oriol, María Luz Martino, Ana Isabel Teruel, José Hernández, Jesús María Hernández-Rivas, Jesús F. San Miguel, Norma C. Gutiérrez. "Global gene expression profiling in the study of the multistep transformation in MM: from MGUS to myeloma status". ***Manuscrito en preparación.***

Lucía López-Corral, María Victoria Mateos, Luis A. Corchete, María Eugenia Sarasquete, Javier de la Rubia, Felipe de Arriba, Juan-José Lahuerta, Ramón García-Sanz, Jesús F. San Miguel, Norma C. Gutiérrez. "Genomic analysis of High Risk Smoldering Multiple Myeloma". ***Haematologica 2012. Feb 13. (Epub ahead of print)***

Lucía López-Corral, María Victoria Mateos, Luis A. Corchete, Luis Palomera, Joan Bargay, Felipe Prósper, José García Laraña, Eduardo Olavarría, Jesús F. San Miguel, Norma C. Gutiérrez. "Gene expression profile of normal hematopoietic bone marrow cells from patients with Smoldering Myeloma is not substantially modified by sustained Lenalidomide/Dexamethasone treatment". ***Submitted for publication.***

Lucía López-Corral, Norma C. Gutiérrez, Jesús F. San Miguel. "Expansion of genetically abnormal PC from MGUS to smoldering MM and MM". ***E-letter Blood published online April 26, 2011.***

Lucía López-Corral, Maria Eugenia Sarasquete, Sílvia Beà, Ramón García-Sanz, Maria Victoria Mateos, Marcos González, Luis Antonio Corchete, Joan Bladé, Albert Oriol-Rocafiguera, Miguel Hernandez, Pilar Giraldo, Jose Hernández, Jesús M Hernández-Rivas, Jesús F San Miguel and Norma C. Gutierrez. "SNP-Based Mapping Arrays Reveal High Genomic Complexity in Monoclonal Gammopathies: From the MGUS to Myeloma Status". ***Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 2011 118: Oral Abstract 295***

L. López-Corral, N. Gutierrez, M. Vidriales, M. Mateos, R. García-Sanz, J. Alonso, J San Miguel. "Evolution from MGUS to MM is characterized by a clonal expansion of genetically abnormal plasma cells". ***Haematologica 2010; 95 (suppl.2): 135 abs. 0336. (15th Congress of the European Hematology Association).***

L. López-Corral, M. Vidriales, M.V. Mateos, A. Rasillo, R. García-Sanz, B. Paiva, J San Miguel, N. Gutierrez. "The progression from MGUS to Smoldering myeloma and eventually to multiple myeloma involves a clonal expansion of genetically abnormal plasma cells". ***Haematologica 2011; 96 (suppl.1): 099. (13th International Myeloma Workshop).***

L. López-Corral, Norma C. Gutiérrez, Maria Belén Vidriales, Maria Victoria Mateos, Ramón García-Sanz, Bruno Pavia, Jesús F. San Miguel. "La progresión de Gammopatía monoclonal de significado incierto a mieloma quiescente y finalmente a mieloma sintomático conlleva una expansión clonal de células plasmáticas genéticamente anormales". ***Haematologica (ed. esp.) Noviembre 2009; 94 Extra 2.CO-46 (LI REUNIÓN NACIONAL DE LA SEHH).***

Lucía López-Corral, ME Sarasquete, LA Corchete, Ramón García-Sanz, Isabel Isidro, Sara González-Briones, Mariví Mateos, Jesús M<sup>a</sup> Hernández, Marcos González, Norma C. Gutiérrez, Jesús F. San Miguel "Bases genómicas de la progresión en etapas de las Gammopatías Monoclonales: de la GMSI al MM sintomático pasando por el MM quiescente". ***Haematologica (ed. esp.) Noviembre 2011; 94 Extra 2. CO-16 (LIII REUNIÓN NACIONAL DE LA SEHH).***

Lucía López-Corral, Norma C. Gutiérrez, Luis A. Corchete, Maria Victoria Mateos, Sara González Briones, Teresa Prieto, Manuel Delgado, Miguel T Hernández, Javier de la Rubia, Laura Rosiñol, Juan José Lahuerta, Luis Palomera, Joan Bargay, José García-

Laraña, José Hernández, Ramón García-Sanz, JM Hernández-Rivas, Jesús F. San Miguel<sup>1</sup>. "Estudio biológico del Mieloma Múltiple Quiescente de Alto Riesgo mediante estudios de perfil de expresión génica", ***Haematologica (ed. esp.) Noviembre 2011; 94 Extra 2. CO-18 (LIII REUNIÓN NACIONAL DE LA SEHH).***



**Financiación recibida para los trabajos**





Los trabajos que componen la tesis titulada “El estudio del genoma y del transcriptoma en las fases evolutivas de las gammapatías monoclonales” han sido beneficiarios de las siguientes becas:

- Fondo de Investigaciones Sanitarias PI080568
- Fondo de Investigaciones Sanitarias PS0901897
- Red española del Mieloma Múltiple RD06/0020/0006
- Gerencia Regional de Salud, Junta de Castilla y León GRS 702/A/11



## **Glosario de abreviaturas**



**aCP:** células plasmáticas aberrantes

**aCP/CPMO:** porcentaje de aCP dentro del compartimento de CP de la MO

**AL:** amiloidosis primaria

**B2micro:**  $\beta$ 2 microglobulina

**CM:** componente monoclonal

**CMF:** citometría de flujo

**CP:** células plasmáticas

**CPMO:** células plasmáticas de la médula ósea

**FLC:** cadenas ligeras libres

**GEP:** perfil de expresión génica

**GMSI:** gammapatía monoclonal de significado incierto

**Hb:** hemoglobina

**HGC:** hibridación genómica comparada

**HISF:** hibridación *in situ* fluorescente

**Ig:** inmunoglobulina

**IGH:** cadena pesada de las inmunoglobulinas

**LCP:** leucemia de células plasmáticas

**LenDex:** lenalidomida más dexametasona

**LLA:** leucemia linfoblástica aguda

**LOH:** pérdida de heterocigosidad

**MDS:** escalado multidimensional

**MM:** mieloma múltiple

**MMQ:** mieloma múltiple quiescente

**MMQ-AR:** mieloma múltiple quiescente de alto riesgo

**MO:** médula ósea

**RT-PCR:** reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

**SAM:** significant analysis of microarrays

**SNP:** polimorfismo de un solo oligonucleotido

**UPD:** disomía uniparental

**UPT:** trisomía uniparental

### **NOMENCLATURA CITOGÉNICA**

**+** (signo más): trisomía, ganancia de un cromosoma

**-** (signo menos): monosomía, pérdida de un cromosoma

**del** (delección): pérdida de un segmento cromosómico

**amp** (amplificación): amplificación de un segmento cromosómico

**p:** brazo corto del cromosoma

**q:** brazo largo del cromosoma

**t** y **Tx** (traslocación): intercambio recíproco de material cromosómico entre dos o más cromosomas

**Mb:** megabases

**Pb:** pares de bases